

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCELIA DE MOURA PEREIRA

USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ADITIVOS EM SILAGENS DE MILHO (*Zea mays*) E CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum*)

CURITIBA

2016

Lucelia de Moura Pereira

Zootecnista

USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ADITIVOS EM SILAGENS DE MILHO (*Zea mays*) E CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração Nutrição e Produção Animal, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências ao título de Mestre em Produção Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Maity Zopollatto

CURITIBA

2016

P436 Pereira, Lucelia de Moura

Uso de óleos essenciais como aditivos em silagens de milho (*Zeamays*) e cana-de-açúcar (*Saccharumofficinarum*). Lucelia de Moura Pereira. Curitiba: 2016.

74 f. il.

Orientadora: Maity Zopollatto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.

Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

1. Essencias e óleos essenciais. 2. Milho – Silagem. Cana-de-açúcar - Silagem. I. Zopollatto, Maity. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDU 668.52:633.3

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "**USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ADITIVOS EM SILAGENS DE MILHO E CANA-DE-AÇÚCAR**" apresentada pela Mestranda **LUCELIA DE MOURA PEREIRA** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata aprovada para receber o Título de Mestre em Zootecnia, na Área de Concentração em Nutrição e Produção Animal.

Curitiba, 30 de março de 2016.

Professora Dra Maity Zopollatto
Presidente/Orientador

Professor Dr. Patrick Schmidt
Membro

Dr. Rafael Canonenco de Araújo
Membro

À minha amada mãe Zelita de Moura Pereira, que fez do meu sonho o sonho dela.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

À minha família, meu pai Moysés Pereira, irmão Sérgio Pereira, e em especial à minha irmã Lucinéia pela acolhida em Curitiba, pelo apoio, amor, confiança, por acreditarem em mim sem julgamentos.

À minha orientadora Maity por toda ajuda, por ter sido como um anjo na minha vida, pelos ensinamentos diários, conversas, conselhos, caronas e adoráveis cafés, por ser um exemplo tanto pelo lado profissional quanto pessoal enfim, por ter sido mais do que uma orientadora e sim uma grande amiga.

Ao professor Patrick, a quem tenho grande admiração por tudo o que representa, como grande profissional e sempre disposto a ajudar e ensinar, pela pessoa que é, sou grata pela oportunidade de conhecer e conviver.

Ao grupo CPFOR, pelos trabalhos que tivemos, experimentos, risadas e aprendizado diário com cada um: Bleine, Camilla, Denise, Jéssica's, Maryon e Rasiel. Cada um com sua peculiaridade, muito obrigada!

Agradecimento em especial ao Charles e Eduardo, por terem sido meus “professores”, por me aguentarem quando nem eu me suportava, pelas conversas, caronas, até por me fazerem perder a paciência e chorar às vezes, sem vocês não teria sido tão legal kkkkk!

Em especial também à Vivian e Álida, pelo fortalecimento da amizade e ajuda. Aos amigos que mesmo de longe estão comigo, sempre dispostos a ajudar, Bruna, Carolina, Emerson, Érica, Karla e Juliana.

À todos os professores que contribuíram para minha formação, pois sem eles nada seria possível, vocês são a esperança de um mundo melhor!

À Universidade Federal do Paraná, e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. E também à Mirian, pelas orientações.

Ao Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade Federal do Paraná e seus funcionários, Air, Aldo, Cleusa, Janice, Marcelo e Ruy.

Ao Laboratório de Bromatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, na Universidade de São Paulo e à todos envolvidos, professor Nussio, César, Edson, Daniel, João Daniel, Pedro e Greici. Obrigada por toda ajuda concedida.

Aos funcionários da fazenda Canguiri pelas contribuições na realização dos experimentos, em especial à Ivone, que nos recebe sempre com muito carinho e sempre disposta a ajudar.

Ao Ateliê 16 pela oportunidade de trabalho, por terem tornado meus dias mais floridos, pela alegria e carinho.

À GRASP pelos aditivos utilizados neste experimento.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto.

À CAPES e Fundação Araucária pela oportunidade de bolsa.

À todas as pessoas que conheci e tive o prazer de conviver nessa estadia em Curitiba, que passaram pelo meu caminho, que sempre expressaram um gesto de carinho, ajuda e um sorriso.

Meu muito obrigada, sem vocês nada disso seria possível.

*A melhor parte das grandes conquistas não é chegar ao objetivo final,
e sim as pessoas que conhecemos durante esse trajeto.
Que deixam um pouco de si, e levam um pouco de nós.*

Adaptado de Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Com intuito de trazer uma nova alternativa ao uso de aditivos em silagens, este trabalho tem por objetivo testar os óleos essenciais timol e carvacrol, como aditivos em silagens de milho e cana-de-açúcar, e avaliar seus efeitos sobre os parâmetros fermentativos, produtos de fermentação, contagem microbiológica, estabilidade aeróbia e composição bromatológica. Os dois experimentos foram conduzidos no Centro de Pesquisa em Forragicultura da UFPR, e foram utilizados 20 silos experimentais divididos em quatro tratamentos, com cinco repetições cada: sendo o controle - sem adição de óleos essenciais; timol – 600 mg kg⁻¹ forragem fresca; carvacrol – 400 mg kg⁻¹ forragem fresca; e um combinado – 250 mg kg⁻¹ de cada óleo por quilo de forragem fresca. Os ensaios foram divididos em duas fases, sendo o primeiro experimento com cana-de-açúcar e o segundo com milho. Os silos permaneceram 90 dias armazenados. A silagem de cana-de-açúcar, num contexto geral, foi alterada pelos aditivos. O tratamento contendo timol teve menor ($p<0,05$) temperatura acumulada e maior estabilidade aeróbia (30,2°C e 145,1 horas, respectivamente) quando comparado ao controle, com 39,5°C e 54,7 horas, respectivamente. Os produtos de fermentação também foram alterados, sendo que a produção de ácido láctico foi menor ($p<0,05$) para o tratamento combinado, de 16,66 g kg⁻¹ MS. A população de bactérias ácido lácticas do timol foi inferior ($p<0,05$) ao controle, 3,77 e 6,20 log UFC/g de forragem fresca, respectivamente. Os resultados com silagem de milho também apresentaram efeitos positivos. As perdas médias de matéria seca dos tratamentos com óleo foram inferiores ao controle (3,39 vs 8,07%). A estabilidade dos tratamentos com óleos foi maior, com médias de 45,1, 46,8, 47,25 e para o controle 35,1 horas. A adição de óleo essencial promoveu efeito não desejado no crescimento de bactérias ácido lácticas com redução para o timol em relação ao controle, 5,07 e 5,84 log UFC/g, respectivamente. Para os produtos de fermentação houve maior produção de etanol no controle, com 8,02 g kg⁻¹ MS_{corr} em relação ao timol, com 6,66 g kg⁻¹ MS_{corr}. Já para o ácido láctico, os menores valores foram encontrados no tratamento combinado, com 30,2 g kg⁻¹ MS_{corr}, e o controle com 48,42g kg⁻¹ MS_{corr}. De maneira geral, nas condições deste experimento, os óleos essenciais não atuaram como era esperado, reduzindo a população de leveduras. Eles tiveram sua ação sobre bactérias ácido lácticas, porém, não prejudicaram a fermentação das silagens, e ainda promoveram certos benefícios dentro de cada ensaio. Como conclusão, os óleos essenciais apresentam potencialidade para serem usados como aditivos, porém mais estudos são indicados.

Palavras chave: carvacrol, compostos orgânicos voláteis, microbiologia, perdas fermentativas, timol

ABSTRACT

In order to bring a new alternative to the use of additives in silage, this study aimed, testing the essential oils thymol and carvacrol, as additives in corn and sugarcane silages, and evaluate their effects on fermentative parameters, fermentation products, microbiological counts, aerobic stability and chemical composition. Both experiments were conducted at the Forage Research Center at UFPR, and there were used 20 experimental silos divided into four treatments, with five replications being: each, control - without addition of essential oils; thymol – 600 mg kg⁻¹ fresh forage; carvacrol – 400 mg kg⁻¹ fresh forage; and a combined - 250 mg kg⁻¹ of each oil per kg of fresh forage. The tests were divided in two phases, the first experiment with sugarcane silage and the second test with corn silage. Silos were stored for 90 days. Silage of sugarcane, in general, was modified by additives. Treatment containing thymol had less accumulated temperature and higher aerobic stability (30.2°C and 145.1 hours, respectively) compared to the control, with 39.5°C and 54.7 hours, respectively. The fermentation products have also changed. The production of lactic acid was lower for the combined treatment, with 16.66 g kg⁻¹ DM. The population of lactic acid bacteria of thymol was lower ($p < 0.05$) than the control (3.77 vs 6.20 log CFU g⁻¹, respectively). The results with corn silage also showed positive effects. Mean dry matter losses of silages treated with essential oils were lower ($p < 0.05$) than control silages (3.39 vs 8.07%). The aerobic stability of treatments with oils was higher, averaging 45.1, 46.8, 47.25 and control with 35.1 hours. The addition of essential oil promoted unwanted effect on the growth of lactic acid bacteria, with reduction for thymol in relation to the control, 5.07 and 5.84 log CFU g⁻¹, respectively. For the fermentation products, there were higher ethanol production in control, with 8.02 kg⁻¹ g MScorr, than for thymol, with 6.66 kg⁻¹ g MScorr. , For the lactic acid, lower values were found in the combined treatment, with 30.2 g kg⁻¹ MScorr, than for the control, 48.42 g kg⁻¹ MScorr. In general, in this experiment the essential oils did not have the expected effect, reducing the yeast population. They reduced lactic acid bacteria, however they did not impaired silage fermentation, and also promoted certain benefits within each test. In conclusion, essential oils have the potential to be used as additives, but more studies are indicated.

Keywords: carvacrol, fermentation losses, microbiology, thymol, volatile organic compounds

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1–	MECANISMOS PROPOSTOS PARA A AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NA CÉLULA BACTERIANA	17
FIGURA 2 –	ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS CARVACROL E TIMOL.....	19
FIGURA 3 –	ESQUEMA SIMPLES DE UM MINISILO UTILIZADO EM EXPERIMENTO.....	31
FIGURA 4 –	VALORES DE pH DURANTE A ESTABILIDADE AERÓBIA DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	40
FIGURA 5 –	VALORES DE pH DURANTE A ESTABILIDADE AERÓBIA DA SILAGEM DE MILHO.....	60
FIGURA 6 –	CARACTERÍSTICAS DA SILAGEM DE MILHO PÓS ESTABILIDADE AERÓBIA	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DA FORRAGEM FRESCA	33
TABELA 2 –	COMPOSIÇÃO BROMATOLOGICA DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	37
TABELA 3 –	PERDAS FERMENTATIVAS E VALORES DE pH NA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	37
TABELA 4 –	CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE PRODUZIDO NA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	38
TABELA 5 –	MICROBIOLOGIA DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR APÓS 90 DIAS DE ENSILAGEM	38
TABELA 6 –	COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRESENTES NA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	39
TABELA 7 –	ESTABILIDADE AERÓBIA DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	40
TABELA 8 –	COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DO MILHO NO MOMENTO DA ENSILAGEM	56
TABELA 9 –	COMPOSIÇÃO BROMATOLOGICA DA SILAGEM DE MILHO.....	57
TABELA 10 –	PERDAS FERMENTATIVAS E VALORES DE pH NA SILAGEM DE MILHO.....	58
TABELA 11 –	MICROBIOLOGIA DA SILAGEM DE MILHO APÓS 90 DIAS DE ENSILAGEM	58
TABELA 12 –	COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRESENTES NA SILAGEM DE MILHO.....	59
TABELA 13 –	ESTABILIDADE AERÓBIA DA SILAGEM DE MILHO	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	- BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS;
CS	- CARBOIDRATOS SOLÚVEIS;
EA	- ESTABILIDADE AERÓBIA;
FDN	- FIBRA INSOLÚVEL EM DETERGENTE NEUTRO;
FDA	- FIBRA INSOLÚVEL EM DETERGENTE ÁCIDO;
MM	- MATÉRIA MINERAL;
MS	- MATÉRIA SECA;
MS _{corr}	- MATÉRIA SECA CORRIGIDA;
OEs	- ÓLEOS ESSENCIAIS;
PB	- PROTEÍNA BRUTA;
t	- TONELADAS;
UFC	- UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS;
PMS	- PERDAS DE MATÉRIA SECA;
PMSE	- PERDAS DE MATÉRIA SECA NA ESTABILIDADE;
Tac	- TEMPERATURA ACUMULADA;
TM	- TEMPERATURA MÁXIMA
TTM	- TEMPO PARA ATINGIR A TEMPERATURA MÁXIMA;

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2.0 INTRODUÇÃO	13
2.1 Produção de Silagem	13
2.2 Silagem de Milho.....	14
2.3 Silagem de cana-de-açúcar	15
3.0 ADITIVOS	15
3.1 Óleos Essenciais	16
3.1.2 Timol e Carvacrol	19
3.1.3 Óleos Essenciais em Silagens	19
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPITULO II - PERDAS FERMENTATIVAS, ESTABILIDADE AERÓBIA E MICROBIOLOGIA DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR ADITIVADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS	26
1.0 INTRODUÇÃO	28
2.0 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Ensilagem	29
2.1.1 Tratamentos.....	29
2.1.2 Silos experimentais	30
2.1.3 Abertura e processamento das amostras.....	31
2.1.4 Análises Bromatológicas	32
2.1.5 Determinação das perdas fermentativas.....	33
2.1.6 Estabilidade Aeróbia	35
2.1.7 Análises estatísticas	36
3.0 RESULTADOS	36
4.0 DISCUSSÃO	40
5.0 CONCLUSÃO.....	47
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPITULO III - PERDAS FERMENTATIVAS, ESTABILIDADE AERÓBIA E MICROBIOLOGIA DE SILAGENS DE MILHO ADITIVADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS.....	52
1.0 INTRODUÇÃO.....	54
2.0 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Análises estatísticas	57
3.0 RESULTADOS	57
4.0 DISCUSSÃO	61
5.0 CONCLUSÃO.....	68
6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

Os primeiros trabalhos utilizando óleos essenciais ou extratos vegetais como aditivos em silagem surgiram em 2004, 2008 e posteriormente em 2012, com silagem de cana-de-açúcar, milho e cevada respectivamente (Bravo-Martins, 2004; Kung Jr. et al., 2008; Chaves et al., 2012).

Dentro da categoria de classificação dos aditivos para silagem, os óleos essenciais são enquadrados como aditivos químicos (Schmidt et al., 2014), e seus efeitos na produção de silagem já foram testados em milho (Kung Jr et al., 2008), cevada (Chaves et al., 2012), ervilha forrageira (Soycan-Onenç et al., 2015) azevém (Foskolos et al., 2016). Porém, na conservação de alimentos seus efeitos fungicidas já foram comprovados, principalmente em leveduras do gênero *Candida*, *Pichia* e *Saccharomyces* (Pahlow et al., 2003). O carvacrol inibiu o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (Knowles e Roller, 2001), e o timol de *Debaryomyces hansenii* (Curtis et al., 1996), espécies de leveduras que são normalmente associadas à deterioração aeróbica em silagens.

A crescente preocupação com segurança alimentar envolve toda a cadeia de produção, desde as matérias-primas, alimentos fornecidos aos animais, e produtos finais do sistema de produção, sejam eles carne, leite ou ovos. Desta forma, a produção de alimentos destinados à nutrição animal também busca atender às exigências, principalmente do mercado externo, de produtos seguros, conhecidos pela sigla GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Na indústria alimentícia, os óleos essenciais já são utilizados, principalmente com finalidade de promover sabor, ou como conservantes naturais em pães, queijos, carnes, chucrute, doces e molhos (Souza et al., 2007).

A possibilidade de aliar controle de microrganismos indesejáveis na produção de silagem, com a utilização de um produto GRAS, o que é o caso dos óleos essenciais, como agente antifúngico e bactericida, representa uma alternativa aos sistemas de produção de ruminantes, além das já existentes no mercado atual, como por exemplo, os inoculantes microbianos.

2.0 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais recebem esse nome devido ao cheiro prazeroso que exalam, e o nome teve origem pelo termo *quinta essentia*, dado por Paracelsus Von Hohenheim (1493 – 1541), descrito por Guenther (1948), onde a quinta essência estaria relacionada com a alma. Há milhares de anos atrás acredita-se que os óleos essenciais já eram utilizados, porém de maneira diferente das de hoje, aonde tinham a finalidade de embalsamar cadáveres em cerimônias religiosas, além dos relatos do uso de essências pelos chineses em 2700 a.C, relatada no livro mais antigo do mundo, *Shen Nung*.

Além dos fins mencionados acima, os óleos essenciais também atuam na conservação dos alimentos (Hyldgaard et al., 2012), característica essa comum à produção de silagem, que visa conservar a forrageira, por meio da queda do pH promovido pelos ácidos durante a fermentação (McDonald et al., 1991; Kung Jr., 2001).

2.1 Produção de Silagem

Dentro do processo de ensilagem, o objetivo principal é preservar o valor nutritivo do material original pela acidificação do meio devido à produção de ácido láctico pelas bactérias ácidas lácticas (BAL), em quantidades suficientes para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis, até que o material seja fornecido aos animais (McDonald et al., 1991).

O processo de ensilagem pode ser dividido em quatro fases, porém uma não possui ponto exato de separação da outra. Primeiramente tem-se a fase aeróbia inicial, onde toda a flora epifítica que veio do campo ainda continua ativa, porém, o manejo adequado como tamanho de partícula e rápida compactação pode auxiliar no rápido fechamento do silo e término desta fase, onde se dá todo o consumo de oxigênio residual. A segunda fase é a fermentação principal, onde os microrganismos anaeróbios, principalmente bactérias ácido lácticas, vão dominar a fermentação e produzir ácidos orgânicos, reduzindo o pH do meio. A terceira fase, denominada fase estável se mantém desde que se tenha anaerobiose, e nela o material permanece conservado. Por último, a fase de abertura do silo, onde o material entra em contato com o oxigênio, que favorece o crescimento de

microrganismos indesejáveis, como leveduras e bolores. Os principais indicadores desta última fase são o calor produzido e o CO₂ resultante da respiração (Muck e Pitt, 1993; Oude Elferink et al., 2000; Pahlow et al., 2003).

O cuidado em todas as fases é de extrema importância para obtenção de um produto final adequado. Porém, algumas perdas são inevitáveis, como é o caso da respiração da planta mesmo após o corte, até que se tenha consumido todo o oxigênio dentro do silo. No entanto, as perdas podem ser minimizadas com manejo correto que inclui o rápido fechamento do silo, com menor tempo de fase respiratória inicial e, conseqüentemente, rápida anaerobiose no meio. Além disso, outros fatores também podem ser controlados como: qualidade da lona, rapidez e eficiência em realizar as etapas da produção de silagem, compactação e tamanho de partícula.

2.2 Silagem de Milho

O Brasil se destaca na produção de diversas culturas, sendo o milho uma das principais. A planta de milho é tida como ideal para produção de silagem pelo seu elevado conteúdo energético, facilidade de obter teor de MS na faixa considerada ideal para ensilagem, entre 30 e 35%, teores mínimos de carboidratos solúveis acima de 3% na matéria original, e baixo poder tampão (pouca resistência à queda do pH), favorecendo boa fermentação microbiana. (Nussio et al., 2001; Deminiciis et al., 2009). Essas características refletem em sua maior utilização se comparada a outras espécies forrageiras, além da sua alta aceitabilidade pelos animais.

Alguns critérios devem ser levados em questão na escolha do híbrido para a produção de silagem, como produção de MS por hectare, resistência à pragas e doenças, e tolerância às variações do clima. Pelo fato da silagem de milho apresentar grande valor nutricional, algumas perdas durante o processo da ensilagem e após a fase de abertura ocorrem. Os produtos da fermentação, como o ácido lático resultante da ação de bactérias ácido lácticas, podem ser consumidos por leveduras e bolores (Lindgren et al., 1985). Desta forma, alguns aditivos são incluídos no processo com finalidade de melhorar a fermentação.

2.3 Silagem de cana-de-açúcar

O Brasil não é apenas o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, é também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol, e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (MAPA, 2015). O setor de produção animal tem se beneficiado com esta cultura, importando e usufruindo de tecnologias desenvolvidas no setor sucroalcooleiro, sendo amplamente utilizadas em sistemas de produção de ruminantes.

Características marcantes favorecem sua utilização, como o alto potencial de produção por área, variedades adaptadas aos diversos ambientes de produção e resistência a doenças e pragas. Aliado aos aspectos agronômicos tem-se também características desejáveis do ponto de vista zootécnico, baixo custo por tonelada de matéria seca, ponto de maturação coincidente com a escassez de forragem e grande amplitude de corte (Santos et al., 2008).

A silagem de cana-de-açúcar requer a utilização de algum aditivo a fim de reduzir a fermentação alcoólica, que promove perdas do material. As leveduras presentes no meio utilizam os carboidratos solúveis da cana-de-açúcar e os convertem em etanol, podendo representar cerca de 49% de perdas na MS, uma vez que a fermentação de 1mol de glicose resulta em 2 moles de etanol, CO₂ e água, sendo que todo o gás carbônico sintetizado é perdido para o ambiente (McDonald et al., 1991).

No processo de ensilagem de cana-de-açúcar há uma grande variedade de leveduras. Já foram isoladas mais de 81 leveduras e as mais encontradas foram a *Torulaspora delbrueckii* (33,33%), *Pichia anomala* (27,16%), *Saccharomyces cerevisiae* (12,34%) e *Candida sake* (8,64%), evidenciando o grande problema que esse microrganismo indesejável promove no processo, e a quantidade e variedade de leveduras que podem ser encontradas (Bravo-Martins, 2004).

3.0 ADITIVOS

A utilização de aditivos no processo de ensilagem é assunto cada vez mais discutido, e vários são os questionamentos a seu respeito. Porém, é importante dizer que dentro do processo de ensilagem, o aditivo não tem a função de resolver

problemas de manejo que ocorreram durante o processo, e sim melhorar a qualidade do produto final, evitar ou diminuir perdas.

Os aditivos para silagem podem ser classificados em cinco grupos principais: estimuladores de fermentação (culturas bacterianas e fontes de carboidratos); inibidores de fermentação (ácidos e outros); inibidores de deterioração aeróbia; nutrientes; e absorventes (McDonald et al., 1991). Porém, na literatura existem três categorias mais simplificadas dos aditivos utilizados no Brasil, sendo classificados como aditivos químicos, microbianos e sequestrantes de umidade (Nussio e Schmidt, 2004). Dentro da classe dos aditivos químicos, pode-se citar os ácidos orgânicos, conservantes e mais especificamente os óleos essenciais (Schmidt et al., 2014). Este último grupo ainda não é muito estudado como aditivo em silagem, ao contrário dos inoculantes microbianos, onde existem muitos trabalhos testando cepas de bactérias ácido lácticas, homofermentativas ou heterofermentativas (Muck et al., 2011; Kung Jr. et al., 2000; Schmidt et al., 2014).

3.1 Óleos Essenciais

Na natureza, os óleos essenciais (OEs) têm papel importante na defesa das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra o ataque de herbívoros. Também podem atuar como meio de propagação da planta por atrair certos insetos que vão proporcionar a dispersão do pólen e sementes, garantindo a perpetuação da espécie (Lee et al., 2003; Burt, 2004).

Os OEs apresentam-se na forma líquida e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com densidade geralmente menor do que a da água. São sintetizados por diferentes estruturas das plantas como broto, flores, folha, caule, galhos, sementes, frutos, raízes e madeira. São armazenados na planta em células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008).

A composição química dos óleos essenciais depende do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e a técnica de destilação. De acordo com Bakkali et al. (2008), apresentam-se como compostos complexos naturais, voláteis, caracterizados por forte odor e constituídos por metabólitos secundários de plantas conhecidos pela atividade bactericida e fungicida.

O efeito comprovado dos compostos isolados extraídos de óleos essenciais de plantas como fungicidas naturais foram encontrados por Chao e Young (2000). A eficácia dos óleos essenciais timol, carvacrol, eugenol e mentol como agentes alternativos no controle de fungos em alimentos foi comprovada por Abbaszadeh et al. (2014), sendo que dentre estes quatro óleos o que apresentou maior eficácia foi o carvacrol, com valor médio de concentração inibidora mínima (MIC) de $154,5\mu\text{ mL}^{-1}$.

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais ainda não foram bem elucidados, porém acredita-se não haver apenas um mecanismo específico na célula alvo, e sim vários efeitos, como observado na Figura 1, que comprometem as ações dos organismos afetados (Lambert et al., 2001).

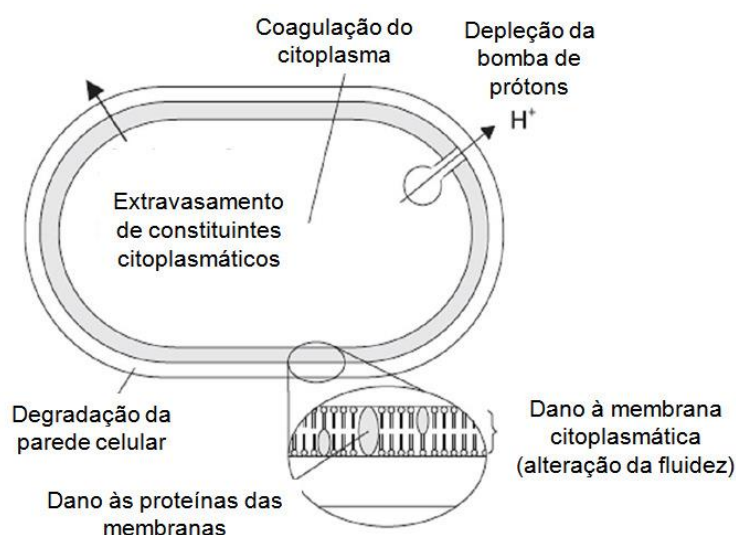


Figura 1. Mecanismos de ação dos óleos essenciais (Adaptado de Burt, 2004)

Os OEs podem promover a degradação da parede celular, ocasionando o enfraquecimento da membrana e alterando sua permeabilidade, comprometendo a perda de componentes intracelulares. Em leveduras do gênero *Candida albicans* eles aumentaram a permeabilidade da membrana, ocasionando o descontrole osmótico da célula (Cox et al., 2000; Bakkali et al., 2008). McDonald et al. (1991), ao identificarem diversas espécies de leveduras no processo de ensilagem, constataram a presença de *Candida albicans* na silagem de capim, a qual pode ocasionar potenciais perdas na silagem devido à deterioração aeróbia.

A ação fungicida de óleos essenciais de alecrim, cebola, manjerição, menta e orégano foi avaliada em colônias teste de *Fusarium* sp. *Aspergillus ochraclus* e *Aspergillus flavus*, onde constatou-se que o óleo essencial de orégano, na

concentração de 1000 mg mL⁻¹, inibiu o crescimento dos fungos, sendo que nos demais óleos a inibição aconteceu a partir de concentrações superiores a 1500 mg mL⁻¹ (Pereira et al., 2006).

Em silagem, fungos filamentosos (bolores) representam um problema, desde a perda de qualidade durante a exposição aeróbia até a relação com a produção de micotoxinas (McDonald et al., 1991). Micotoxinas são consideradas contaminantes e oferecem risco à saúde dos animais e seres humanos (Amaral e Nussio, 2011).

No Brasil, os OEs e extratos vegetais estão compreendidos dentro da classe de aditivos como aromatizantes, (ANVISA, 2007) e são reconhecidos e autorizados na Europa pela Diretiva do Conselho 70/524/EEC Cap.III,

Devido à capacidade de atuar no controle de microrganismos, inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas a fim de determinar concentrações eficientes, métodos de extração e aplicação em alimentos tanto para humanos como para animais, e também em manipulação ruminal (Benchaar et al., 2007; Calsamiglia et al., 2007; Baser e Buchbauer, 2010; Franz et al., 2010; Patra e Yu, 2015).

Os óleos essenciais estão incluídos no grupo químico de terpenos, que correspondem a um grupo de compostos antimicrobianos extraídos dos óleos essenciais, os quais são ativos contra um amplo espectro de microrganismos, sendo que os monoterpenos mais ativos são o carvacrol e o timol. Os terpenóides são terpenos que sofreram modificações bioquímicas por meio de enzimas, que adicionam moléculas de oxigênio e movem ou removem grupos metil (Caballero et al., 2003). Os terpenóides podem ser subdivididos em álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis e epóxios.

Os monoterpenos timol e carvacrol possuem estrutura semelhante, se diferenciando basicamente pela localização do grupo hidroxila (Figura 2).

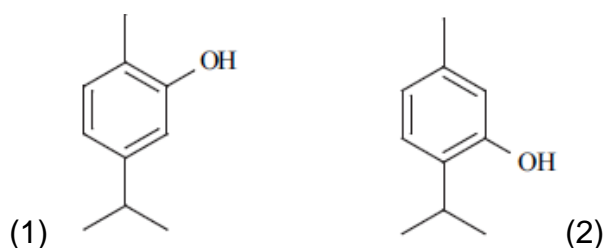


Figura 2. Estrutura química dos compostos carvacrol (1) e timol (2)

Fonte: adaptado de Lambert et al. (2001).

3.1.2 Timol e Carvacrol

O timol e carvacrol são os monoterpenos encontrados em maior quantidade nos óleos essenciais de tomilho e orégano, sendo o timol o componente predominante no tomilho e o segundo composto em maior quantidade no orégano. Já o carvacrol é o primeiro composto em maior quantidade no orégano e em seguida o timol (Lambert et al., 2001).

O mecanismo de ação ainda é bastante discutido na literatura, e os estudos com timol demonstram que este composto interage com a membrana das células, alterando a permeabilidade, e causando descontrole osmótico (Helander et al., 1998; Lambert et al., 2001).

Já o carvacrol teve seus efeitos estudados em membranas de bactérias Gram-negativas, atingindo principalmente a membrana do citoplasma, resultando no transporte passivo de íons, carregando H^+ para dentro da célula e transportando K^+ para fora (Helander et al., 1998). Outro estudo com carvacrol, em células de *E. coli*, constatou que este composto afeta a síntese responsável pelos flagelos, fazendo com que ocorra a redução da motilidade desse microrganismo (Burt et al., 2007).

3.1.3 Óleos Essenciais em Silagens

Dentro do processo de ensilagem existe uma vasta gama de microrganismos, sendo alguns desejáveis e outros indesejáveis. Os microrganismos indesejáveis podem trazer grandes prejuízos, perdas econômicas e danos aos animais que consomem este material com baixa qualidade, estando as leveduras e bolores incluídos nessa categoria. No processo de ensilagem, além das leveduras, outros microrganismos promovem grande preocupação, pelas altas perdas que podem representar, como por exemplo o *Clostridium*, *Bacillus sp.* e *Listeria*, que além de promoverem perdas, este último pode comprometer a saúde dos animais e dos seres humanos (McDonald et al., 1991).

No processo de ensilagem, as leveduras representam grande preocupação pelas altas perdas que podem resultar, e algumas espécies desses microrganismos foram identificadas em silagens sendo: *Candida sp.*, *Hansenula sp.*, *Pichia sp.*,

Saccharomyces sp., *Torulopsis sp.* e *Endomycopsis sp.* (Woolford, 1990; McDonald et al., 1991; Pahlow et al., 2003).

A ação fungicida do carvacrol e timol sobre *Candida albicans* foi verificada pela interrupção na biossíntese do ergosterol e na integridade da membrana (Ahmad et al., 2011). Vários autores puderam verificar o efeito comprovado dos óleos essenciais na inibição de leveduras e bactérias em alimentos (Lambert et al., 2001; Bakkali et al., 2006; Calo et al., 2015). Adicionalmente, a combinação dos óleos essenciais timol e carvacrol resultou em efeito sinérgico aditivo sobre *Staphylococcus aureus* e *Penicillium aeruginosa* (Lambert et al., 2001).

Os óleos essenciais não apresentam empecilhos para serem utilizados como aditivos em silagens, já que seu efeito é dependente do pH, sendo mais eficientes em pH mais baixos. Em relação ao meio de atuação, em ambientes anaeróbios sua ação contra patógenos é favorecida, o que demonstra sua aplicabilidade no ambiente específico das silagens (Juven et al., 1994).

Bravo-Martins (2004), ao avaliar adição de extratos vegetais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), capuchinha (*Tropaeolum majus*), hortelã (*Menthapiperita*) e sálvia (*Salvia officinalis*) na produção de silagem de cana-de-açúcar, verificou efeito inibitório no desenvolvimento de leveduras, surgindo assim como alternativa promissora para preservar a qualidade fermentativa no processo de ensilagem.

Em silagem de cevada, a inclusão de óleos essenciais (eugenol, timol e carvacrol ou limoneno) nas concentrações de 37,5, 75 e 120 mg kg⁻¹ na MS, diminuiu o crescimento de leveduras durante exposição da silagem ao ar por até 7 dias (Chaves et al., 2012).

Por outro lado, não foram observados efeitos na estabilidade aeróbia e no processo fermentativo utilizando uma mistura de óleos essenciais contendo timol, eugenol, vanilina, limoneno em concentrações de 40 e 80 mg kg⁻¹ de forragem fresca em silagens de milho, porém os autores observaram que não houve resistência em diminuir o pH (3,68) (Kung et al., 2008).

Os efeitos de OEs, timol, carvacrol, eugenol, cinamaldeído e capsaicina em quatro doses, 0, 50, 500 e 2000 mg kg⁻¹ de forragem fresca, foram testados em silagem de azevém, e a adição de timol e eugenol na maior dose (2000 mg kg⁻¹ de forragem fresca) inibiu a deaminação, efeito observado com o carvacrol na dose de 500 mg kg⁻¹, o que do ponto de vista de preservação de nutrientes é interessante no

processo de ensilagem. Os autores relatam que as enzimas da planta são responsáveis por parte da degradação protéica durante a ensilagem, indicando que a possível ação dos OEs seria a inibição da atividade dessas enzimas (Foskolos et al., 2016).

Em silagem de leguminosa, (ervilha forrageira), a inclusão de OEs como aditivo, com a finalidade de avaliar os efeitos sobre a qualidade de silagens resultou no aumento dos teores de proteína bruta e matéria seca, e diminuição da quantidade de CO₂, além de inibir a formação de mofos no período de exposição ao ar nas silagens tratadas com 400 mg kg⁻¹ de forragem fresca de extratos de canela (41,5 g de cinamaldeído propilenoglicol e 35,28 g de cinamaldeído, em 100 g de extrato). O tratamento contendo 400 mg kg⁻¹ de forragem fresca de extrato de orégano (59 g de carvacrol e 12 g de timol, em 100 g de extrato) não apresentou efeito similar, porém com a combinação dos dois óleos, na mesma dosagem de 440 mg, houve efeito sinérgico sobre o ácido acético, e antagônico durante a exposição aeróbia, perdas de matéria seca e formação de mofos (Soycan-Önenç et al., 2015).

A possibilidade de estudar uma dose eficiente de óleo essencial aliada ao controle de leveduras e fungos, mesmo com uma possível redução de bactérias ácido lácticas, já que essas bactérias são mais susceptíveis à ação dos óleos essenciais (Burt, 2004), por estarem classificadas como gram-positivas, sem prejudicar o processo fermentativo, justifica este trabalho.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. e51-e56, 2014.

AHMAD A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.** Dis. 30, 41–5010.1007/s10096-010-1050-8, 2011.

AMARAL, R.C.; NUSSIO, L.G. Fungos e micotoxinas. In: Simpósio de Produção e Utilização de Forragens Conservadas, 4. Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, p.221-249, 2011.

ANVISA. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. Resolução - RDC no 2. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasil, 2007.

BAKKALI, F. et al. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 606, n. 1, p. 27-38, 2006.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Technology**. .p. 446-475, 2008.

BASER, K. H.C.; BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC. p. 585 2010.

BENCHAAR, C. et al. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 886-897, 2007.

BRAVO-MARTINS, E. C. **Identificação de leveduras envolvidas no processo de ensilagem de cana-de-açúcar e utilização de extratos vegetais como seus inibidores**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, 2004.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **Int. J. Food Microbiol.** **94**: 233-253, 2004.

BURT, S. et al. Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. **International journal of food microbiology**, v. 119, n. 3, p. 346-350, 2007.

CABALLERO, B. et al. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Amsterdam: Academic Press. 2003.

CALO, R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CALSAMIGLIA, S. et al. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essentials Oil Research**, [S.l.], v. 12, p. 630-649, 2000.

CHAVES, A. et al. Effects of cinnamon leaf, oregano and sweet orange essential oils on fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 4, p. 906-915, 2012.

COX, S.D. et al. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal. Appl. Microbiol.** 88, 170–175, 2000.

CURTIS, O. et al. Comparison of the inhibitory and lethal effects of synthetic version of plant metabolites (anethole, carvacrol, eugenol, and thymol) on food spoilage yeast (*Debaromyces hansenii*). **Food Biotechnology**. 10:55–73, 1996.

DEMINICIS, B. et al. Silagem de milho - Características agronômicas e considerações. **Revista Eletrônica de Veterinária**.10, pg: 1-18- 2009.

FOSKOLOS, A. et al. Effects of essential oil compounds addition on ryegrass silage protein degradation. **Canadian Journal of Animal Science** 10.1139/cjas-2015-0025, 2016.

FRANZ, C. et al. Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 327-340, 2010.

GUENTHER, E. 1948. The Essential Oils. **D. Van Nostrand, New York**. Disponível em: <https://archive.org/stream/essentialoilsvol030201mbp#page/n25/mode/2up>, acesso: em 01/05/2016.

HELANDER, M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

HYLDGAARD, M. et al. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology** pg 1-24, v-3, 2012.

JUVEN, B.J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 626–631. 1994.

KNOWLES, J., and S. ROLLER. Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. **Journal Food Prot.** 64:1542–1548, 2001.

KUNG Jr., L. et al. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. **Journal Dairy Science** 91:4793–4800, 2008.

KUNG Jr., L. Silage fermentation and additives. **Science and Technology in the Feed Industry**, v. 17, p. 145-159, 2001.

LAMBERT, R. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology** 91, 453–462, 2001.

LEE, K.W., et al. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British Poultry Science** 2003; 44(3):450-457, 2003.

LINDIGREN, S. et al. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.36,p.765-774,1985.

MAPA, 2015. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/ministerio>.

MCDONALD, P. et al. **The biochemistry of silage**. Marlow: Chalcombe Publications,1991.

MUCK, R.E.; PITT, R.E. Ensiling and its effect on crop quality silage. In: Silage Production from Seed to Animal. 1993. New York. **Proceedings...New York: NRAES**, 67, p. 57- 66. 1993.

NUSSIO, L. et al. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. **Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas**, v. 1, p. 127-145, 2001.

NUSSIO, L.G; SCHIMIDT, P. Tecnologia de produção e valor alimentício de silagens de cana-de-açúcar. In: Simpósio Sobre Produção E Utilização De Forragens Conservadas, 2. **Maringá. Anais... Maringá: UEM**, p. 1-33, 2004.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H. et al. Silage fermentation processes and their manipulation. In: **Fao Eletronic Conference On Tropical Silage**, Rome. Silage making in the tropics with emphasis on smallholders; proceedings. Rome: FAO, p.17-30, 2000.

PAHLOW, G. et al. 2 Microbiology of Ensiling. **Silage science and technology**, v. 42, p. 31, 2003.

PATRA, A. K.; YU, Z. Essential oils affect populations of some rumen bacteria in vitro as revealed by microarray (RumenBactArray) analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

PEREIRA, M. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

SANTOS, M.C. Influência da utilização de aditivos químicos no perfil da fermentação, no valor nutritivo e nas perdas de silagens de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.9, p.1555-1563, 2008.

SAS INSTITUTE. *SAS user's guide: statistics, version 9.0*. Cary: SAS Institute, 2002.

SCHMIDT, P. et al. Uso estratégico de aditivos em silagens: quando e como usar? In: Simpósio: Produção e Utilização de Forragens Conservadas, 5, 2014, Maringá. **Anais...** Maringá: p. 243-264, 2014.

SOUSA, D. et al. Influence of the chirality of (R)-(-)-and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: A comparative study. **Chirality**, v. 19, n. 4, p. 264-268, 2007.

SOYCAN-ÖNENÇ, S. et al. The Effect of Oregano and Cinnamon Essential Oils on Fermentation Quality and Aerobic Stability of Field Pea Silages. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 28, n. 9, p. 1281, 2015.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 2, p. 101-116, 1990.

CAPITULO II - PERDAS FERMENTATIVAS, ESTABILIDADE AERÓBIA E MICROBIOLOGIA DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR ADITIVADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar perdas fermentativas, microbiologia e estabilidade aeróbia em silagens de cana-de-açúcar aditivadas com óleos essenciais. Os tratamentos testados foram: controle, sem adição de óleo essencial; timol, 600 mg kg⁻¹ de forragem fresca; carvacrol, 400 mg kg⁻¹ de forragem fresca; e o combinado, 250 mg kg⁻¹ de forragem fresca de timol mais 250 mg kg⁻¹ de forragem fresca de carvacrol, sendo 5 repetições por tratamentos, totalizando 20 silos experimentais. Houve diferença estatística na variável pH e o tratamento com menor valor ($P < 0,05$) foi o carvacrol (3,62). Nas variáveis de análises bromatológicas, os OEs foram eficientes em conservar os teores de carboidratos solúveis das silagens em relação ao controle, com média de 24,3% MS para as silagens tratadas e 16,8% MS para o controle. O menor valor na contagem de BAL foi observado para o timol, com 3,7 log ufc/g de forragem fresca, seguido do carvacrol com 5,4 log ufc/g de forragem fresca, sugerindo maior ação do timol sobre bactérias. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para as variáveis perdas de MS, perda de gases, perda de efluente, pH do efluente, leveduras e fungos. Na estabilidade aeróbia foi possível observar menores valores ($P < 0,05$) de temperatura máxima (30,2°C) e pH (3,71) para o timol. Para as variáveis temperatura acumulada, estabilidade aeróbia e perdas de MS não houve diferença significativa ($P > 0,05$). O timol foi eficiente em controlar BAL, porém na produção de silagem este fator não é desejado, visto que essas bactérias utilizam carboidratos solúveis para produzir ácido lático, que conserva o material. Entretanto o processo fermentativo não foi afetado.

Palavras chave: bactérias ácido lácticas, carvacrol, fermentação, leveduras, timol

CHAPTER II – FERMENTATIVE LOSSES, AEROBIC STABILITY AND MICROBIOLOGY OF SUGARCANE SILAGES TREATED WITH ESSENTIAL OILS

Abstract: The objective of this study was to evaluate fermentation losses, microbial counts and aerobic stability of sugarcane silages additivated with essential oils. For both silages there were used four treatments: control, without essential oils; thymol, 600 mg kg⁻¹ fresh forage; carvacrol, 400 mg kg⁻¹ fresh forage and combined (250 mg kg⁻¹ fresh forage of thymol and 250 mg kg⁻¹ of carvacrol), being 5 replications per treatment, totalizing 20 experimental silos. There was a statistical difference for pH, with the lowest value ($P < 0.05$) for carvacrol treatment (3.62). Lower BAL count was observed for thymol, with 3.7 log cfu/g fresh forage, followed by carvacrol with 5.4 log cfu/g fresh forage, suggesting a greater action of thymol on bacteria, as its bactericidal effect is enhanced in anaerobic environment. There was no statistical difference ($P > 0.05$) for DM losses, gas losses, effluent losses, effluent pH, yeast and molds. During aerobic stability, it was observed lower maximum temperature (30.2°C) and pH (3.71) values for thymol. Accumulated temperature, aerobic stability and DM losses did not show statistical difference ($P > 0.05$). Thymol was effective in controlling LAB, but in silage production this is not desired, since these bacteria use soluble carbohydrates as substrate to produce lactic acid, which preserves the material. However, the fermentative process was not affected.

Keywords: lactic acid bacteria, carvacrol, fermentation, thymol, yeast

1.0 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é de extrema importância tanto no cenário da agricultura, na produção de etanol, quanto da pecuária, na forma de alimento in natura ou silagem. Siqueira et al. (2014) mencionam que com o estabelecimento do Programa Proálcool, as pesquisas com cana-de-açúcar se intensificaram. Além da indústria produtora de etanol, que busca o desenvolvimento desta cultura, com melhoramento genético a fim de melhorar a produtividade, os produtores podem usar desta tecnologia para destinar seu uso à alimentação animal.

A qualidade do material ensilado é extremamente importante, pois está diretamente relacionada ao desempenho animal. Tendo em vista a dificuldade operacional na utilização do material fresco picado para o fornecimento no cocho, a silagem de cana-de-açúcar torna-se excelente alternativa como alimento volumoso.

Contudo, ao ensilar este material, existem alguns entraves a serem resolvidos, pois devido à alta quantidade de carboidratos solúveis e ampla flora epifítica, principalmente leveduras vindas do campo, perdas fermentativas são provocadas durante o processo (Schmidt, 2009). A rota de fermentação das leveduras tem como produto final etanol e gás carbônico, a partir da glicose (McDonald et al., 1991).

Neste sentido, a fim de evitar perdas, Schmidt et al. (2014) salientam que o uso de aditivos em silagens de cana-de-açúcar é incorporado ao processo quase que como uma obrigatoriedade. Os aditivos foram divididos em três categorias simples por Nussio e Schmidt (2004), sendo eles: aditivos químicos, microbianos e sequestrantes de umidade. Dentro da categoria de aditivos químicos pode-se encontrar os ácidos orgânicos, conservantes, amônia e óleos essenciais (Schmidt et al., 2014). O conhecimento sobre a ação dos óleos essenciais como aditivos em silagens ainda é muito vago, com poucos trabalhos na área, sendo um com silagem de milho (Kung Jr. et al., 2008) um com silagem de cevada (Chaves et al., 2012), e mais recentemente com silagem de ervilha forrageira (Soycan-Onenç et al., 2015) e silagem de azevém (Foskolos et al., 2016)

Os óleos essenciais atuam como agentes de defesa nas plantas (Bakkali et al., 2008, e na produção de alimentos atuam sobre microrganismos indesejáveis, principalmente fungos e bactérias, conservando os alimentos (Pereira et al., 2006). Os óleos essenciais são considerados aditivos seguros tanto na alimentação

humana quanto animal, o que os torna ainda mais atrativos, visto a necessidade da população por produtos considerados “seguros”, denominados de GRAS (*Generally Recognized As Safe*)

O objetivo deste experimento foi avaliar a inclusão de óleos essenciais (timol e carvacrol) como aditivos na silagem de cana-de-açúcar, com intuito de analisar as perdas fermentativas, contagem microbiológica e estabilidade aeróbia.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensilagem

O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisa em Forragicultura (CPFOR), localizado na fazenda experimental pertencente à Universidade Federal do Paraná. A cana-de-açúcar utilizada foi a variedade clone RB03-6066, colhida no dia 25/08/2014, desprovida de folhas (devido à uma falha de comunicação, a cana-de-açúcar fornecida veio com propósito de plantio, sem folhas e palhada) oriunda da Fazenda Experimental da UFPR localizada em Paranavaí, região noroeste do Paraná. A chegada do material na fazenda experimental se deu no dia 27/08/2014, sendo o grau Brix de 24,2°, mensurado por refratômetro no dia da ensilagem. A forragem foi picada em picadora acoplada ao trator com regulagem de corte de 7 mm. Após a picagem, a cana-de-açúcar foi subdividida em quatro montes com 70 kg de matéria verde cada, sobre lona de polietileno com finalidade de aplicar os tratamentos.

2.1.1 Tratamentos

Os tratamentos utilizados foram: controle, sem adição de óleos essenciais; timol, 600 mg kg⁻¹ de forragem fresca; carvacrol, 400 mg – kg⁻¹ de forragem fresca; e combinado, 500 mg kg⁻¹ de forragem fresca, sendo 50% da quantidade de timol e 50% de carvacrol, sendo que todos os aditivos utilizados continham 99% de pureza. As dosagens utilizadas para compor os tratamentos tiveram por base dois artigos sendo o primeiro deles o de Kung Jr. et al. (2008), que utilizaram um “blend” de óleos essenciais em silagem de milho, nas dosagens de 40 e 80 mg kg⁻¹ de forragem fresca, porém os autores não encontraram efeitos na estabilidade aeróbia e crescimento de microrganismos nas silagens aditivadas. Já Chaves et al. (2012), ao

incluírem óleos essenciais como aditivos em silagens de cevada, com dosagens de 125, 200, 400 mg kg⁻¹ de forragem fresca, verificaram um decréscimo no crescimento de leveduras em silagens exposta ao ar. Os trabalhos acima citados serviram como base para a tomada de decisão das dosagens utilizadas neste experimento. Como o experimento com dosagens maiores foi eficiente, principalmente em controlar leveduras após a exposição ao ar, foi usado como base para propor as dosagens deste experimento.

Para permitir maior homogeneidade dos aditivos sob os quatro montes de silagem foram retirados 2 kg de forragem verde picada, e homogeneizados com cada aditivo, a fim de facilitar a incorporação do produto nos 70 kg de material verde de cada tratamento.

2.1.2 Silos experimentais

Foram confeccionados 20 silos experimentais compostos por baldes plásticos de 20L de capacidade, com tampa contendo válvula do tipo Bunsen para avaliação das perdas gasosas durante o armazenamento. No fundo de cada balde foi colocada uma grade, separada da silagem por uma tela fina de plástico e uma camada de tecido fino de algodão, para avaliação quantitativa e qualitativa do efluente como exemplificado na Figura 2. Cerca de $12 \pm 0,5$ kg de forragem fresca foram pesados para cada silo experimental e compactados com auxílio dos pés. Após o término da compactação os mesmos foram tampados, pesados e vedados com cola plástica para evitar entrada de ar, e permaneceram armazenados por 90 dias em temperatura ambiente. Cada silo foi considerado uma unidade experimental.

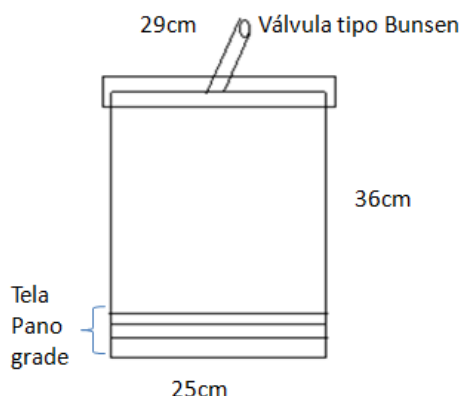


Figura 3. Esquema simples de um silo experimental utilizado no experimento

2.1.3 Abertura e processamento das amostras

Após 90 dias de armazenamento dos silos foi retirada a cola plástica e mensurado o peso de cada unidade. Após aferir o peso, os silos foram esvaziados e o conteúdo colocado em sacos plásticos para homogeneização e amostragem.

O conjunto vazio do silo (balde, tampa, grade, tela e tecido) foi pesado para a determinação da tara úmida. Para a determinação de matéria seca (MS) a 60°C, foram coletadas duas amostras por repetição, com aproximadamente 300 g cada. Já para determinação do pH, compostos orgânicos voláteis (COV) e microbiologia foram retiradas três amostras com aproximadamente 50 g cada.

Para mensurar o pH utilizou-se 25 g de amostra adicionados a 225 mL de água destilada, homogeneizados por 1 minuto com bastão de vidro e aferido o pH com pHmêtro digital (PG 1400, GEHAKA). Para a análise de COV foram pesadas 25 g de amostra mais 225 mL de água destilada, homogeneizadas em liquidificador por 1 minuto, posterior filtragem do extrato em três camadas de gaze e em papel filtro. O filtrado foi adicionado em tubos tipo “ependorf”, identificados, congelados e enviados para o Laboratório de Bromatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, na Universidade de São Paulo, onde os COV foram analisados de acordo com a metodologia descrita por Daniel et al. (2013), por cromatografia líquida.

Os extratos aquosos para o plaqueamento em meio seletivo foram preparados em sacos estéreis para homogeneização de alimentos, com 25 g de amostra adicionados de 225 mL de solução salina preparada à base de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio hexahidratado ($\text{CaCl}_{2.6} \text{H}_2\text{O}$) e carbonato de sódio (NaHCO_3), e autoclavada um dia antes de ser utilizada (Kung e Ranjit, 2001). As amostras foram homogeneizadas durante quatro minutos em aparelho homogeneizador de amostra tipo Stomacher (Marconi, modelo MA 440/CF) e filtradas em três camadas de gaze. Os extratos aquosos foram submetidos a diluições decimais em solução estéril (leveduras e bolores) ou em caldo MRS (MRS Broth ACC-Rogosa e Sharpe, Merek, Alemanha) para bactérias. Para contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) utilizou-se o petrifilm AC, incubado a 32°C por 48 horas em jarras de anaerobiose (Anaerobac, Probac, Brasil). Para a contagem de bolores e leveduras utilizou-se o petrifilm YM, e estes foram incubados em estufa de cultura (MA 415 mini, Marconi, Brasil) a 23°C por 72 horas para contagem de leveduras e mantidos até 120 horas para contagem de bolores.

Para as análises do efluente, os mesmos foram separados e mensurado o pH e o grau Brix °C, e parte foi destinada para mensurar o teor de MS a 60°C por 10 dias.

2.1.4 Análises Bromatológicas

Para realizar as análises bromatológicas as amostras secas em estufa de ventilação forçada a 60°C, foram moídas em moinho tipo Willey com peneiras de malha 1 mm, e armazenadas em potes plásticos identificados. As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pertencente à Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP. Para determinar os teores de MS a 105°C foram pesados 2 g de amostra seca e moída em cadinhos de porcelana acondicionados em estufa a 105°C por 12 horas. Tanto os valores de cinzas quanto de MS 105°C foram determinados segundo AOAC (1990).

Os teores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) foram determinados pelo método sequencial adaptado pela Ankon, com base na metodologia proposta por Van Soest et al. (1991). Os teores de proteína bruta (PB) foram determinados pelo fator de multiplicação de 6,25 do teor

de nitrogênio (N) da amostra, o qual foi realizado pelo método DUMAS em analisador de nitrogênio (FP-528, Leco, EUA). Os teores de carboidratos solúveis (CS) foram determinados de acordo com a metodologia adaptada de Hall (1990) por Cabezas-Garcia et al. (2013), que consiste da extração alcoólica por quatro horas em agitação, adicionando 100 mL de etanol 80% em 0,50 g de amostra seca a 60°C e moída, e curva padrão constituída a partir de concentrações crescentes conhecidas de glicose. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda $\lambda=490$ nm. As análises de digestibilidade *in vitro* foram realizadas utilizando o fermentador artificial (Daisy Fermenter) com base na metodologia proposta por Holden (1999) e adaptada pela Ankon. Os valores de pH, MS, PB, FDN, FDA, cinzas e CS foram determinados na forragem fresca no momento da ensilagem e são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição bromatológica da forragem fresca no momento da ensilagem

Variáveis	Tratamentos ¹				Média	DP ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado		
MS (%)	31,1	31,5	31,1	30,8	31,2	0,28
Cinzas (% MS)	0,6	1,0	0,5	0,4	0,66	0,26
FDN (% MS)	42,0	43,5	40,4	43,3	42,3	1,43
FDA (% MS)	26,5	28,0	26,0	27,9	27,1	1,00
PB (% MS)	1,2	0,9	1,0	1,6	1,23	0,30
CS (% MS)	50,3	51,2	54,1	53,0	52,2	1,71

¹ Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg de timol + 250 mg/kg de carvacrol; ²DP- Desvio padrão.

2.1.5 Determinação das perdas fermentativas

A pesagem do conjunto (grade+tela+pano) nos silos, no momento da abertura, subtraído seu peso original, possibilita a estimativa do efluente produzido, o qual foi expresso em quilos de efluente produzidos por tonelada de forragem úmida, conforme a Equação 1. Para quantificação dos gases produzidos, expressa

em percentual da MS a 105°C, foi utilizada a Equação 2, proposta por Schmidt (2006) e publicada por Jobim et al. (2007)

$$E = \frac{(PCab - PCfe)}{MFfe} \times 1000 \quad (1)$$

Onde:

E = produção de efluente (kg/t massa verde);

PCfe = peso do conjunto (balde + grade + tela + pano + tampa) no fechamento (kg);

PCab = peso do conjunto (balde + grade + tela + pano + tampa) na abertura (kg);

MFfe = massa de forragem no momento do fechamento (kg).

$$G = \frac{[(PBfe - PCfe) \times MSfe] - [(PBab - PCfe) \times MSab]}{[(PBfe - PCfe) \times MSfe]} \times 1000 \quad (2)$$

Onde:

G = perdas por gases (% MS);

PBfe = peso do balde cheio no fechamento (kg);

PBab = peso do balde cheio na abertura (kg);

PCfe = peso do conjunto (balde + areia + tela + pano + tampa) no fechamento (kg);

MSfe = Teor de MS da forragem no momento do fechamento (%);

Sab = Teor de MS da silagem no momento da abertura (%).

Para quantificar as perdas totais de matéria seca (PMS) é calculada a diferença entre o peso bruto da MS inicial e final dos silos, em relação à quantidade de MS ensilada, de acordo com a Equação 3, proposta por Schmidt (2006)

$$PMS = \frac{(MSi - MSf)}{MSi} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

PMS = Perda Total de MS (%);

MS_i = Quantidade de MS inicial. Peso do silo após enchimento – peso do silo vazio sem a forragem, antes do enchimento (tara seca) x teor de MS da forragem na ensilagem;

MS_f = Quantidade de MS final. Peso do silo cheio antes da abertura – peso do conjunto vazio, sem a forragem, após a abertura dos silos (tara úmida) x teor de MS da forragem na abertura;

Os teores de Matéria Seca corrigidos (MS_{CORRI}), foram calculados com base na equação (4) proposta por Weissbach (2009) para silagens de capim.

$$MS_{corr} = MS + 1,05 - 0,059 \text{ pH} - 0,08 \text{ AGV} + 0,08 \text{ AL} + 0,77 \text{ PD} + 0,87 \text{ BD} + 1,00 \text{ OC} \quad (4)$$

Onde:

MS = teor de matéria seca obtido em estufa (% MV);

pH = pH da silagem;

AGV = soma das concentrações dos ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico (% MV);

AL = concentração de ácido láctico (% MV);

PD = concentração de 1,2-propanodiol (% MV);

BD = concentração de 2,3-butanodiol (% MV);

OC = soma das concentrações de acetona, acetato de etila, acetato de propila, lactato de etila, metanol, etanol, 1-propanol, 2-butanol, álcool isopropílico (% MV).

2.1.6 Estabilidade Aeróbia

A estabilidade aeróbia (EA) foi avaliada segundo a metodologia de Kung et al. (2000), definido como o tempo em horas para elevar a temperatura da silagem em 2°C em relação ao ambiente em que o material foi exposto. Foram coletados 4 kg de amostras de todas as repetições dentro de cada tratamento e colocadas dentro de um balde sem tampa, os quais foram alocados em sala com temperatura controlada a 25°C por 240 horas. Dentro de cada balde, exatamente no meio da silagem, foi inserido um *data-logger* (modelo EL – USB, Lascar), com a finalidade de realizar as leituras da temperatura a cada 30 minutos, além de um *data-logger* no ambiente para mensurar a temperatura na sala. No início e no fim do período de avaliação

foram coletadas amostras de silagem para obter os teores de MS e diagnosticar possíveis perdas durante a exposição da silagem ao ar.

2.1.7 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Para compor os tratamentos avaliados, utilizaram-se dois óleos essenciais, timol e carvacrol, sozinhos ou combinados, além do controle, totalizando quatro tratamentos, com cinco repetições para cada forragem avaliada, num total de 20 unidades experimentais.

As análises estatísticas dos silos foram realizadas utilizando-se a metodologia dos quadrados mínimos, por meio do procedimento GLM do programa estatístico SAS, versão 9.1.3 para Windows (SAS, 2002). As médias foram comparadas com o uso do Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Para os dados de pH da estabilidade utilizou-se o proc Mixed do SAS.

3.0 RESULTADOS

Os resultados das análises bromatológicas da silagem de cana-de-açúcar são apresentados na Tabela 2. Os valores de FDN que apresentaram maior diferença entre si foram entre o carvacrol e o timol, 2,7 pontos percentuais superior para este último, sendo essa diferença também verificada nos valores de FDA (2,1 unidades percentuais). As diferenças na digestibilidade ocorreram principalmente entre o carvacrol, timol e controle, sendo o timol cerca de três pontos percentuais inferior ao carvacrol, que quando comparado ao controle esse número foi superior chegando a 3,8 pontos percentuais. Já para os carboidratos solúveis, os valores permaneceram próximos tendo uma variação pequena com média de 24,3 % para as silagens aditivadas, sendo a diferença entre o controle superior a 7,5 pontos percentuais.

Tabela 2. Composição bromatológica das silagens de cana-de-açúcar.

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
MS _{corr} (%)	30,5	31,4	32,0	31,4	0,06
Cinzas, (% MS)	0,8	0,7	0,7	0,8	0,44
FDN (% MS)	47,1 ^{ab}	47,1 ^{ab}	44,4 ^b	47,9 ^a	0,36
FDA (% MS)	30,8 ^a	30,1 ^{ab}	28,0 ^b	30,9 ^a	0,04
PB (% MS)	1,5	1,4	1,2	1,4	0,44
DIVMS (% MS)	66,6 ^b	67,3 ^b	70,4 ^a	68,3 ^{ab}	0,95
CS (% MS)	16,8 ^b	25,2 ^a	24,1 ^a	23,7 ^a	0,39

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

¹Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg de timol + 250 mg/kg de carvacrol; ²Erro padrão da média

Na Tabela 3 são apresentadas as perdas fermentativas e valores de pH das silagens de cana-de-açúcar aditivadas com óleos essenciais. A maior magnitude de perdas, superando em mais de duas vezes o carvacrol foi observada no controle.

Tabela 3. Perdas fermentativas e valores de pH nas silagens de cana-de-açúcar.

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
pH	3,67 ^b	3,71 ^b	3,62 ^c	3,77 ^a	0,02
PMS (%)	13,2 ^a	8,7 ^{ab}	5,7 ^b	9,7 ^{ab}	1,00
PG ³ (%)	7,4	2,5	0,4	3,4	1,04
PE ⁴ (kg/t forragem fresca)	60,1	61,1	54,7	62,8	1,69

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

¹ Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg forragem fresca de timol + 250 mg/kg forragem fresca de carvacrol.

² Erro padrão da média; ³ Perdas por gases; ⁴ Perdas por efluente.

Os valores relacionados com as medidas do efluente estão apresentados na Tabela 4. Em relação à média dos dados de Brix° dos tratamentos contendo OEs, de 16,1, o controle teve uma redução de 6,6% nos resultados.

Tabela 4. Características do efluente produzido nas silagens de cana-de-açúcar.

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
MS (%)	13,9 ^b	15,6 ^a	15,2 ^a	14,6 ^{ab}	0,20
°Brix	15,0 ^b	16,0 ^a	16,3 ^a	15,9 ^a	0,14
pH	3,3 ^a	3,3 ^a	3,3 ^b	3,4 ^a	0,008

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

¹ Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg forragem fresca de timol + 250 mg/kg forragem fresca de carvacrol

²Erro padrão da média

As contagens de bactérias ácido lácticas, leveduras e bolores são apresentadas na Tabela 5. A maior diferença entre as contagens de BAL no momento da abertura da silagem foram entre o timol e controle, com o primeiro apresentando contagem inferior em 40,3% em relação ao controle.

Tabela 5. Microbiologia das silagens de cana-de-açúcar

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
BAL ³ , log ufc/g forragem	6,2 ^a	3,7 ^b	5,5 ^{ab}	5,9 ^a	0,31
Leveduras, log ufc/g forragem	5,6	6,0	5,7	5,5	0,08
Bolores, log ufc/g forragem	1,2	3,0	1,6	2,2	0,37

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$);

³BAL- bactéria ácido láctica; ¹ Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg forragem fresca de timol + 250 mg/kg forragem fresca de carvacrol; ² Erro padrão da média

Os dados podem ser elucidados com a apresentação dos compostos orgânicos voláteis avaliados na silagem apresentados na Tabela 6. Dos COV mensurados, os que apresentam maior significância são os ácidos láctico e acético e o etanol, seguido do 2,3-Butanediol. O valor de ácido láctico mensurado no tratamento combinado esteve 21% inferior ao restante dos tratamentos. Já o acetato de etila do controle foi superior cerca de 49% em relação às silagens aditivadas.

Tabela 6. Compostos orgânicos voláteis presentes na silagem de cana-de-açúcar.

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
<i>g kg⁻¹ MS_{CORR}</i>					
Ácido láctico	21,1 ^a	20,1 ^a	21,8 ^a	16,6 ^b	0,05
Ácido acético	20,7	21,8	22,1	21,2	0,03
Etanol	81,9 ^a	60,5 ^b	65,4 ^{ab}	71,8 ^{ab}	0,29
2,3-Butanediol	7,5	6,9	6,9	7,7	0,01
Ácido fórmico	5,2 ^b	13,1 ^a	12,6 ^a	11,4 ^a	0,08
<i>mg kg⁻¹ MS_{corr}</i>					
Acetato de etila	439,5 ^a	215,0 ^b	220,2 ^b	236,4 ^b	25,12
Lactato de etila	385,5 ^a	216,8 ^b	265,7 ^b	220,5 ^b	19,66
Ácido propiônico	211,3 ^c	350,7 ^a	323,3 ^{ab}	254,9 ^{bc}	16,20
1,2-Propanodiol	66,8 ^a	28,5 ^b	25,6 ^b	25,7 ^b	4,49
Ácido iso-butírico	47,6 ^b	50,2 ^b	67,0 ^a	24,8 ^c	3,62
Metanol	39,7	41,1	35,3	33,6	1,23
Ácido valérico	25,0 ^a	3,9 ^{ab}	2,1 ^b	2,0 ^b	3,39
Ácido Butírico	24,0 ^a	12,2 ^{ab}	8,5 ^b	7,3 ^b	2,19
Ácido iso-valérico	18,6	4,6	3,3	2,9	2,42
Acetona	9,4 ^a	6,1 ^{ab}	4,6 ^b	4,8 ^b	0,63
Álcool iso-propílico	ND	ND	ND	ND	ND
Acetato de propila	ND	ND	ND	ND	ND
2-Butanol	0 ^b	1,4 ^a	2,6 ^a	0,1 ^b	0,28
1-Propanol	ND	ND	ND	ND	ND

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).¹ Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg de timol + 250 mg/kg de carvacrol.² Erro padrão da média.

Na Tabela 7 estão demonstradas as variáveis relativas à estabilidade aeróbia das silagens. Nesta variável o timol apresentou superioridade em horas na estabilidade, sendo a principal diferença de 90,4 horas em relação ao controle. Já em relação à temperatura máxima, o controle apresentou temperatura 9,3°C mais elevada quando comparado ao timol.

Tabela 7. Estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar

Variáveis	Tratamentos				EPM
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
Tac ¹ , °C	2695,7	846,7	2160	2363,1	206,5
TM ² , °C	39,5 ^a	30,2 ^b	35,8 ^a	35,9 ^a	0,91
EA ³ , horas	54,7 ^b	145,1 ^a	81,9 ^{ab}	63,4 ^b	11,01
PMSE ⁴ , %	16,1	9,5	18,1	13,3	1,67

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

¹Temperatura Acumulada; ²Temperatura Máxima; ³ Estabilidade Aeróbia; ⁴ Perdas de Matéria Seca durante a estabilidade aeróbia; ⁵ Erro padrão da média.

Ao mensurar os valores de pH a cada dois dias no período de estabilidade aeróbia da cana-de-açúcar, foi possível acompanhar o perfil, como observado na Figura 4. Os valores de pH são crescentes a partir do segundo dia de estabilidade, com uma pequena queda de pH no início da exposição ao ar.

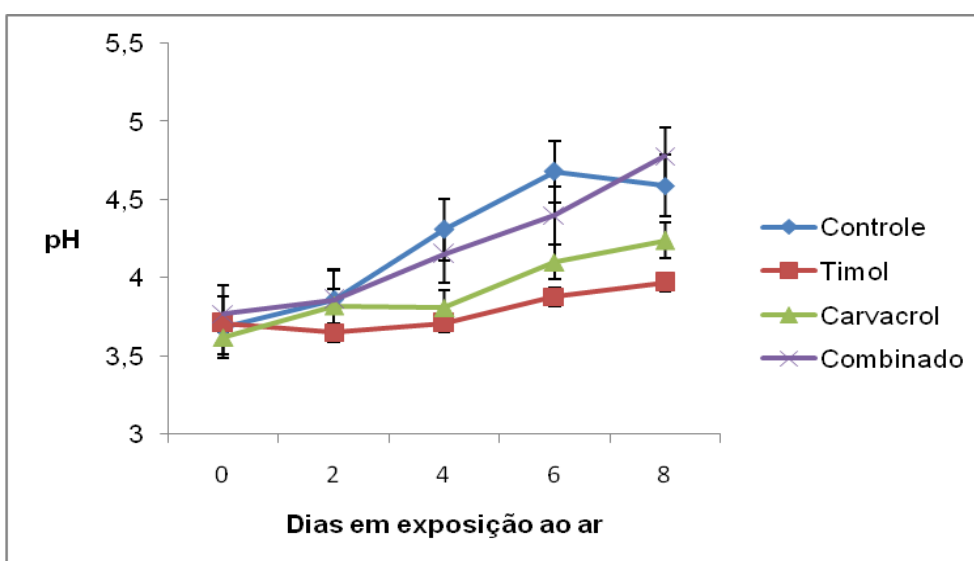


Figura 4. Valores de pH mensurados durante a estabilidade aeróbia da silagem de cana-de-açúcar.

4.0 DISCUSSÃO

Os valores de MS_{corr} da silagem não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$), e estão acima dos verificados por Souza (2015), que observou média de 274 g/kg⁻¹ de MS_{corr}, no mesmo material. Para os valores de cinzas também não foi

verificada diferença estatística ($P > 0,05$), porém estão próximos aos encontrados por Souza (2015), que teve média de $11,8 \text{ g kg}^{-1}$ de MS, e abaixo dos dados encontrados por Santos et al. (2008) e Queiroz et al. (2015), com valores de 22,50 e $28,80 \text{ g kg}^{-1}$ na MS, respectivamente.

Os valores de FDN e FDA estão abaixo dos encontrados por Bravo-Martins (2004) e Schmidt et al. (2011), e próximos ao encontrados por Souza (2015). Menores valores de FDN e FDA podem ser justificados pela ausência de folha da cana-de-açúcar.

Os valores de DIVMS estão acima da média verificada na literatura por Santos et al. (2008), que encontraram valores de 48,74% de digestibilidade para silagens de cana-de-açúcar, já para os carboidratos solúveis, Queiroz et al. (2015) encontraram valores de CS de 4,1 % MS, e Daniel et al. (2015) de 11,7 % MS em silagens de cana-de-açúcar não aditivadas, sendo que os valores encontrados pelo primeiro autor estão bem abaixo aos encontrados neste trabalho (Tabela 2). Os valores observados neste trabalho são considerados muito superiores, essa alta digestibilidade pode estar associada à falta de folha na planta de cana, aumentando a proporção de carboidratos solúveis. Estas silagens, apesar do baixo teor de FDN, FDA e PB pela ausência folha, tiveram teores maiores de outras frações como CS e digestibilidade.

O tratamento que teve maior eficiência em reduzir o pH foi o carvacrol. Os valores de pH estão de acordo com o observado em silagens de cana-de-açúcar por Pedroso et al. (2007), Daniel et al. (2015) e Queiroz et al. (2015), de 3,69, 3,84 e 3,60, respectivamente. O pH é uma variável de extrema importância dentro da produção de silagem e pode servir como parâmetro para mensurar a qualidade da fermentação. A queda do pH em silagens sugere que houve maior produção de ácido láctico, acético ou propiônico, decorrentes da fermentação anaeróbia por bactérias do substrato. No caso da cana-de-açúcar, o carboidrato solúvel principal sendo a sacarose presente na planta. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Kung et al. (2008), que utilizando um mix de óleos essenciais (timol, eugenol, vanilin e limoneno) em silagem de milho obtiveram valores de 3,72, 3,71, 3,66 e 3,64, respectivamente. Os resultados encontrados por Kung et al. (2008) e neste trabalho diferem de Chaves et al. (2012), que fizeram a inclusão de óleos essenciais (orégano, laranja doce e folha de canela) em silagem de cevada nas concentrações de 37,5, 75 e 120 mg kg^{-1} de MS, e não observaram diferença

estatística entre os tratamentos para o pH (4,0). Os dados demonstram que mesmo o orégano, em menores concentrações, foi eficiente, sendo perfeitamente justificável, pois se comparado aos outros componentes é o que apresenta maior porcentagem de carvacrol em sua molécula.

No presente estudo houve efeito significativo ($p < 0,05$) entre o controle e carvacrol nas PMS, sendo o carvacrol mais eficiente em controlar perdas se comparado ao controle. Quando se observa o menor pH do carvacrol comparado ao controle, isso reflete em menores perdas, pois quanto menor o valor desta variável, maior a inibição da ação de leveduras. Os valores de PMS do presente estudo foram inferiores aos encontrados na literatura por Pedroso et al. (2007), Santos et al. (2008), Schmidt et al. (2011), Queiroz et al. (2015) e Souza (2015), mesmo para o tratamento controle (13,2%), com valores de perdas de MS nos tratamentos sem aditivos de 18,2; 34,3; 14,4; 23,5; 14,7%, respectivamente.

Para a PG não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém, o que chamou atenção foram valores de perdas negativos encontrados em três repetições do tratamento contendo carvacrol, o que fez com que a média de perdas fosse extremamente baixa, possivelmente por erros na amostragem.

Os valores de perdas por efluente, apesar da ausência de diferença estatística, ($P > 0,05$) estão acima dos valores observados por Santos et al. (2008), Schmidt et al. (2011) e Souza (2015), de 31,3, 5,4 e 19,8 kg/t de massa verde (MV), respectivamente. Por outro lado, Siqueira et al. (2010) observaram valores superiores, com 76,2 e 115,6 kg/t de MV em silagem de cana-de-açúcar crua e queimada, respectivamente. Uma das possíveis causas da elevada produção de efluente nessa cana-de-açúcar seria a ausência de MS, além do excesso de compactação e/ou baixos teores de MS no momento da ensilagem. A produção de efluente é quase inevitável dentro do sistema de produção de silagem, porém, quando os processos de produção de silagens são realizados dentro das condições adequadas, teores de MS entre 29 e 33% (Pedroso et al., 2005), e sem excessiva compactação, a produção de efluente é mínima. O efluente no sistema de produção de silagem é uma variável indesejada, visto que indica perdas de nutrientes. Segundo McDonald et al. (1991), este material contém grandes quantidades de compostos orgânicos como açúcares, ácidos orgânicos, proteínas, minerais (cálcio, potássio e magnésio) e outros constituintes do material ensilado. Na literatura, os dados referentes a MS do efluente são escassos. Souza (2015), avaliando silagem

de cana-de-açúcar com inoculantes microbianos, mensurou esta variável com média de todos tratamentos de 13,6%.

A diferença estatística encontrada no presente trabalho pode ser atribuída ao tipo de aditivo utilizado. A maior MS do efluente encontrada nos tratamentos timol e carvacrol pode ser atribuída ao maior carreamento de carboidratos solúveis, ácidos orgânicos, minerais e compostos nitrogenados solúveis (McDonald et al., 1991). Por outro lado, os dados de pH foram superiores aos encontrados pela autora acima citada, a qual obteve média de 2,92. O pH das silagens contendo carvacrol foi de 3,62, considerado menor valor ($p < 0,05$) em relação aos outros tratamentos e quando foi mensurado o valor de pH do efluente também foi observado menor valor em relação aos outros tratamentos, sugerindo que essas duas variáveis podem estar interligadas.

Loures et al. (2003), ao compararem diferentes densidades de compactação de capim-elefante, sobre a produção e composição do efluente, verificaram que à medida que aumentava a densidade, havia um incremento no teor de sólidos totais do efluente. Neste experimento a densidade foi calculada para atingir 650 kg/m^3 de matéria verde, dentro do recomendado por Bernardes e Rego (2014) para compactação de silagens de até 700 kgm^3 de matéria verde.

O grau Brix° pode ser exemplificado como uma análise subjetiva, por quantificar apenas a quantidade total de carboidratos solúveis por meio de uma escala numérica (Ribeiro et al., 2010), ou seja, representa o teor aproximado de açúcar presente em determinado composto. Ao mensurar o Brix° no efluente foram verificados valores estatisticamente iguais ($P > 0,05$) para as silagens aditivadas com óleos essenciais, exceto para o controle que apresentou o menor ($P < 0,05$) valor (15°Brix), indicando menores perdas de açúcares na forma de efluente. Os resultados de graus Brix° acompanham os resultados de MS do efluente, como observado na Tabela 4. Os valores de grau Brix estão diretamente ligados às concentrações de carboidratos solúveis, e ao comparar as Tabelas 2 e 4, é possível notar que as silagens contendo óleos essenciais preservaram os teores de carboidratos solúveis na planta, e o Brix desses tratamentos também foram maiores, pois havia maior concentração de carboidratos.

A menor contagem de BAL de 3,7 log ufc/g de forragem fresca observada no tratamento timol, é muito inferior ao encontrado na literatura. Silva et al. (2015) encontraram, com 21 e 100 dias de ensilagem de cana-de-açúcar, valores de 7,98 e

6,93 log ufc/g de forragem fresca, respectivamente. Kalembe e Kunicka (2003) relataram que condições aeróbias e anaeróbias podem influenciar a atividade dos óleos essenciais, e evidenciaram que o timol tem sua maior atividade antibacteriana em ambiente anaeróbio, ou seja, está de acordo com a menor contagem de bactérias neste tratamento. Porém, as contagens aconteceram na abertura dos ensaios, após os 90 dias de fermentação, sendo que se tivessem sido realizadas em momentos diferentes poderiam ter alterações, já que o crescimento de microrganismos no processo depende de muitas variáveis, não podendo tomar essa contagem como uma representação de todo o processo. Entretanto, ao observar a produção de ácido láctico da Tabela 6, pode-se ver que a produção desse ácido não foi prejudicada.

Mesmo com a baixa contagem de BAL para o timol ainda houve produção de ácido láctico condizente com o encontrado por Queiroz et al. (2015), de 26 g kg⁻¹ MS_{CORR}. Foskolos et al. (2016), ao adicionar timol e carvacrol nas concentrações de 0,50, 500 2000 mg/kg de forragem fresca, verificaram que na maior concentração, tanto para o timol quanto para o carvacrol, houve redução na produção de ácido láctico de 45,9 para 3,54 mg/100mL e 58,7 para 12,2 mg/100mL, respectivamente, em silagens de azevém. O ácido láctico na silagem tem grande importância na conservação do material, e além disso, para os ruminantes, representam uma fonte de energia, sendo prontamente absorvidos na parede do rúmen (Jayasuriya e Hungate, 1959).

O efeito esperado dos óleos era sobre a redução no crescimento de leveduras, já que em silagens estas resultam em perdas (McDonald et al., 1991). Foskolos et al. (2016), ao incluir timol e carvacrol (0, 50, 500 e 2000 mg/kg de forragem fresca) em silagem de azevém observaram apenas menor contagem de BAL no tratamento contendo timol na maior dosagem (2000 mg/kg). Evrendilek (2015), ao estudar óleos essenciais extraídos de anis, folha de louro, casca de canela, cravo, erva doce, lúpulo, orégano, casca de laranja, hortelã e tomilho, relacionou estes compostos com a inibição de 10 bactérias por modelos lineares, sendo que dessas 10 bactérias, quatro eram gram-positivas, *Listeria innocua*, estafilococos coagulase-negativos, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, e seis eram Gram-negativas, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Klebsiella oxytoca*. Através de análise de regressão o autor constatou que o orégano e o tomilho

revelaram-se como inibidores mais potentes independentemente do tipo de bactéria, sendo que o timol e carvacrol são os principais componentes antimicrobianos presentes no óleo essencial de orégano (Nostro et al., 2004)

Os bolores também não sofreram efeito em relação aos tratamentos, e as contagens estão de acordo com os encontrados em silagens de cana-de-açúcar sem aditivos por Daniel et al. (2015) e Silva et al. (2015), de 1,74 e 2,70 log ufc/g de forragem fresca, respectivamente. A ausência de efeito antifúngico dos óleos essenciais deste trabalho diverge dos resultados encontrados por Krisch et al. (2011), que verificaram a ação antifúngica dos óleos essenciais em leveduras.

Os dados de ácido acético, apesar da ausência de efeito dos tratamentos, estão de acordo com o observado por Daniel et al. (2015), em silagens de cana-de-açúcar, com valores de 20 g kg⁻¹ MS_{CORR}.

O etanol foi o COV que teve maior produção entre todos os mensurados na silagem, no entanto, este composto não é desejável, pois está relacionado a perdas de MS (Daniel, 2011). Em média, as concentrações de etanol estiveram abaixo das observadas por Daniel et al. (2015) e Souza et al. (2015), de 134 e 84,1g kg⁻¹ MS_{CORR} em silagens de cana-de-açúcar. A baixa produção de etanol do tratamento contendo timol em relação ao controle não se deve às leveduras, pois não foi encontrada diferença na contagem desses microrganismos. Segundo Muck (2010), bactérias heterofermentativas podem produzir etanol a partir de produtos de fermentação ou do substrato propriamente dito encontrado na planta. Como a população de BAL do tratamento contendo timol foi menor, isso pode explicar a menor produção de etanol neste tratamento em relação ao controle. Porém, mesmo com a menor contagem de bactérias ácido lácticas do timol, quando é relacionado com os dados de produção de ácido acético, os valores entre timol, carvacrol e controle estatisticamente foram iguais.

Os valores de ácido propiônico dos tratamentos timol e carvacrol estão acima dos valores encontrados por Daniel et al. (2013) em silagem de cana-de-açúcar não aditivada, de 284 mg kg⁻¹ MS_{corr}, embora os tratamentos controle e combinado tenham apresentado valores inferiores, próximos aos encontrados por Schmidt et al. (2007) em silagem de cana-de-açúcar, de 0,23% MS.

As proporções de CS encontradas na abertura dos silos experimentais indicam que havia substrato para ser consumido por microrganismos como leveduras e bolores durante a exposição ao ar.

Outro composto que apresentou diferença foi o ácido fórmico, composto este relacionado com BAL homofermentativas como o *Lactobacillus casei* e *L. lactis* e com heterofermentativas do gênero *Leuconostoc*, as quais podem converter o piruvato a acetato e formato (McDonald et al., 1991). O alto teor de ácido fórmico observado demonstra uma alta atividade dessas bactérias, sendo que em forragens com alto teor de carboidratos solúveis, que é o caso da cana-de-açúcar, este ácido restringe a produção de ácido acético e ácido láctico, conservando os carboidratos solúveis da planta, como foi observado na Tabela 2 (McDonald et al., 1991).

As variáveis temperatura acumulada e perdas de MS não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$) entre os tratamentos. Já para a temperatura máxima houve efeito ($P<0,05$), onde o tratamento contendo timol se manteve com temperatura menor ($30,2^{\circ}\text{C}$), diferindo do combinado e controle. Essa elevação da temperatura durante o período de exposição ao ar sugere o crescente número de microrganismos aeróbios que degradam os substratos (ácidos orgânicos) produzidos durante a fermentação, gerando calor durante a exposição ao ar. No tratamento contendo timol pode ter ocorrido essa menor colonização e consumo de substrato, permitindo que as silagens ficassem estáveis por mais horas. Os resultados de estabilidade aeróbia encontrados por Kung et al. (2008) em seu experimento com óleos essenciais usando doses de 40 e 80 mg kg⁻¹ de forragem fresca mostram que não houve efeito dos óleos essenciais sobre esta variável.

Chaves et al. (2012) obtiveram resultados diferentes ao incluir os OEs eugenol, carvacrol e timol ou limoneno em silagens de cevada. Os autores constataram que os tratamentos contendo 120 mg kg⁻¹ de forragem fresca de óleo essencial em silagem de cevada foram eficientes em inibir o crescimento de leveduras durante exposição aeróbia, em relação ao tratamento controle.

Microrganismos promovem a deterioração aeróbia das silagens, sendo que sua principal ação consiste em degradar o ácido láctico produzido durante a fermentação, promovendo a elevação do pH durante a exposição ao ar (McDonald et al., 1991).

Os menores valores de pH ($P<0,05$) apresentados na Figura 4, foram para o tratamento contendo timol, seguido do carvacrol. Podem existir duas hipóteses quanto a esta variável. A primeira seria que durante o período de ensilagem houve menor colonização de bactérias ácido lácticas pela atividade bactericida dos óleos, e aumento de leveduras que consumiram todo substrato durante a fermentação,

sendo essa hipótese descartada, pois ao mensurar o teor de carboidratos solúveis na abertura do experimento, ainda havia quantidade para ser fermentada. Os tratamentos contendo óleos essenciais tiveram valores superiores, com média de 24,3% e o controle com 16,8% (Tabela 2). A segunda hipótese seria que durante a exposição ao ar da silagem de cana-de-açúcar os óleos foram eficientes em inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis, sendo essa hipótese a mais aceita, haja vista que mesmo após a abertura havia substrato, sacarose remanescente da fermentação e produtos de fermentação, como ácido lático a ser consumido, evidenciando a ação do timol e carvacrol em controlar microrganismos indesejáveis durante o período de exposição ao ar, fazendo com que a silagem se mantivesse estável mesmo após a abertura do silo.

O tratamento que apresentou o maior ($P < 0,05$) pH foi o combinado, porém sua elevação se deu de forma gradativa, seguido do controle, fato que sugere maior colonização por microrganismos que degradam o ácido lático nestes dois tratamentos.

5.0 CONCLUSÃO

Em face do exposto pode-se dizer que os óleos essenciais não foram eficientes em reduzir os microrganismos indesejáveis como as leveduras e bolores, e contrariamente, o timol teve ação sobre a contagem de bactérias ácido lácticas, o que não é desejável do ponto de vista de um bom processo de fermentação. De modo geral, a menor contagem somente representa as silagens na abertura dos silos, e durante o processo fermentativo, esses microrganismos poderiam estar presentes em maior quantidade. Porém, este efeito não prejudicou a qualidade de fermentação destas silagens, mesmo com a menor contagem de BAL, o pH reduziu de forma satisfatória, pode ter ocorrido seleção de BAL, além da produção de ácido durante a fermentação, com efeitos positivos na estabilidade aeróbia do material. Pela redução de perdas de matéria seca observadas, o carvacrol mostrou-se o óleo com melhor efeito na ensilagem de cana-de-açúcar do presente estudo.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analyses of the AOAC. 15ed. Washington, **Assoc. OFF. Agric. Chem.**, p. 1105-1106. 1990.

BAKKALI, F. et al. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 606, n. 1, p. 27-38, 2006.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BERNARDES, T.F.; REGO, A.C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1852-1861, 2014.

BRAVO-MARTINS, C. E. C. **Identificação de leveduras envolvidas no processo de ensilagem de cana-de-açúcar e utilização de extratos vegetais como seus inibidores**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

CABEZAS-GARCIA, E.H et al. Metodologia de Carboidratos Solúveis, adaptada a partir de Hall, 1990, ESALQ, Piracicaba, 2013.

CHAVES, A. et al. Effects of cinnamon leaf, oregano and sweet orange essential oils on fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 4, p. 906-915, 2012.

DANIEL, J.L.P. **Contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens**. 2011. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-19102011-141855/>>. Acesso em: 2016-05-31.

DANIEL, J.L.P. et al. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 185, p. 101-105, 2013.

DANIEL, J.L.P. et al. Effect of chemical and microbial additives on the dynamics of gas production during the fermentation of sugarcane silage. **XVII International Silage Conference, Piracicaba- São Paulo**, pg. 446-447, 2015.

EVRENDILEK, G.A. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. V.202, p. 35-41, 2015.

FOSKOLOS, A. et al. Effects of essential oil compounds addition on ryegrass silage protein degradation. **Canadian Journal of Animal Science** 10.1139/cjas-2015-0025, 2016.

HALL, M.B. Neutral detergent-soluble carbohydrates: nutritional relevance and analysis, a laboratory manual. University of Florida. (Extension Bulletin, 339), April, 1990.

HOLDEN, L.A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1791-1794, 1999.

JAYASURIYA, G.C.N.; HUNGATE, R.E. Lactate conversions in the bovine rumen. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 82, n. 2, p. 274-287, 1959.

JOBIM, C.C., et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.101-119, 2007.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KRISCH, J. et al. Essential oils against yeasts and moulds causing food spoilage. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**, Formatex Research Center, Spain, p. 1135-1142, 2011.

KUNG JR., L. et al. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** 91:4793–4800, 2008.

KUNG JR., L.; RANJIT, N.K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.5, p.1149-1155, 2001.

KUNG JR., L. et al. Microbial populations, fermentation end products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1479-1486, 2000.

LOURES, D.R.S. et al. Características do efluente e composição químico-bromatológica da silagem sob diferentes níveis de compactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1851-1858, 2003

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcomb e Publications, 1991.

MUCK, R.E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 183-191, 2010.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicilin-resistant Staphylococci to oregano essential oil, carvacrol, and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.191-195, 2004.

NUSSIO, L.G; SCHIMIDT, P. Tecnologia de produção e valor alimentício de silagens de cana- de- açúcar. In: Simpósio Sobre Produção E Utilização De Forragens Conservadas, 2. Maringá. **Anais... Maringá**: UEM, 2004. p. 1-33.

PEDROSO, A.F. et al. Efeito do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 558-564, 2007.

PEDROSO, A.F. et al. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, v.62, n.5, p.427-432, 2005.

PEREIRA, M. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

QUEIROZ, O.C.M. et al. Effect of a dual purpose inoculant on the quality and nutrient losses from corn silage produced in farm scale silos. **Journal of Dairy Science**, New York, v.95, n. 6, p. 33543362, 2013.

QUEIROZ, O.C.M. et al. Effect of plant population on the morphology and yield of corn plants and the chemical composition of corn silage. **XVII International Silage Conference - Piracicaba, São Paulo**, pg, 264-265, 2015.

SANTOS, M.C. et al. Influência da utilização de aditivos químicos no perfil da fermentação, no valor nutritivo e nas perdas de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1555-1563, 2008.

SCHMIDT, P. et al. Novos aditivos microbianos na ensilagem da cana-de-açúcar: composição bromatológica, perdas fermentativas, componentes voláteis e estabilidade aeróbia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 543-549, 2011.

SCHMIDT, P. Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, 2006.

SCHMIDT, P.; SOUZA, M. C.; BACH, C. B. Uso estratégico de aditivos em silagens quando e como usar. In Simpósio: Produção e Utilização de Forragens Conservadas, Maringá. **Anais Maringá: Nova Sthampa**, 2014.p.243-264, 2014 .

SILVA, T.C. et al. Effect of a chemical additives containing sodium benzoate, potassium sorbate, and sodium nitrate on the microbial populations and aerobic stability of sugarcane silage. **XVII International Silage Conference- Piracicaba, São Paulo**, p.148-149, 2015.

SILVA, A.V. et al. Consumo e digestibilidade dos nutrientes em bovinos recebendo dietas contendo silagens de milho e sorgo, com e sem inoculante microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2469-2478, 2006.

SIQUEIRA, R.G. et al. Avanços Tecnológicos na Produção e Utilização de Silagens de Qualidade. **V Simpósio: Produção e Utilização de Forragens Conservadas, UEM**. p.117-156, 2014.

SIQUEIRA, G.R. et al. Queima e aditivos químicos e bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 103-112, 2010.

SOUZA, C.M. Impacto ambiental da produção de silagens: Revisão da literatura e avaliação experimental em silos laboratoriais. Dissertação apresentada como parte das exigências ao título de Mestre em Ciência Animal, UFPR.

SOYCAN-ÖNENÇ, S. et al. The Effect of Oregano and Cinnamon Essential Oils on Fermentation Quality and Aerobic Stability of Field Pea Silages. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 28, n. 9, p. 1281, 2015.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **User's guide**. Cary: SAS Institute, 525p 2002.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. D.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Chanpaign, v. 74, p. 3583- 3597, 1991.

WEISSBACH, F. Prediction of biogas production potential of silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, Madison, USA. **Proceedings...** Madison, USA, p.189-190, 2009.

CAPITULO III - PERDAS FERMENTATIVAS, ESTABILIDADE AERÓBIA E MICROBIOLOGIA DE SILAGENS DE MILHO ADITIVADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS.

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar dois óleos essenciais, sozinhos ou combinados, na silagem de milho. Foram utilizados 20 “minisilos” experimentais, divididos em quatro tratamentos: controle, sem adição de OEs; timol, 600 mg kg⁻¹ de forragem fresca; carvacrol, 400 mg kg⁻¹ de forragem fresca; e combinado, 250 mg kg⁻¹ de forragem fresca de timol e 250 mg kg⁻¹ de forragem fresca de carvacrol, com cinco repetições cada em um delineamento inteiramente casualizado. Os silos foram armazenados por 90 dias em temperatura ambiente. Foram determinadas as perdas de MS, gases e efluente; contagem microbiológica; teor de compostos orgânicos voláteis; estabilidade aeróbia e aferição dos valores de pH ao longo do tempo de exposição ao ar; além da composição bromatológica da forragem fresca e da silagem. As perdas de matéria seca em média foram menores ($P < 0,05$) nos tratamentos contendo óleos, de 3,39 %, em relação ao controle, de 8,07 %. A estabilidade aeróbia média dos óleos essenciais foi maior ($P < 0,05$), de 46,4 horas, enquanto no controle foi de 35,1 horas. As perdas durante a exposição ao ar não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$). Já os compostos orgânicos voláteis apresentaram diferença estatística, com teores de ácido láctico do controle maiores ($P < 0,05$) que no combinado, com 48,4 g kg⁻¹ MS_{corr} e 30,2 g kg⁻¹ MS_{corr}, respectivamente. Os teores de etanol também apresentaram diferenças ($P < 0,05$), com a maior produção de 8,02 g kg⁻¹ MS_{corr} para o tratamento controle, e a menor produção de 6,66 g kg⁻¹ MS_{corr} para o tratamento contendo timol. As variáveis cinzas, FDA, PB, DIVMS e perdas por efluente não apresentaram efeito significativo ($P > 0,05$) entre os tratamentos, já a MS foi menor ($P < 0,05$) no tratamento controle, com 30,1%, no qual também foi observada menor ($P < 0,05$) quantidade de carboidratos solúveis (1,96% na MS). A MS e os CS dos demais tratamentos tiveram média de 30,97% e 2,36% na MS, respectivamente. Os óleos essenciais nas condições deste experimento não apresentaram efeitos ($P > 0,05$) sobre a contagem de leveduras, porém promoveram menores perdas de matéria seca e contribuíram para maior estabilidade aeróbia das silagens de milho aditivadas.

Palavras-chave: bactéria ácido láctica, carvacrol, compostos orgânicos voláteis, fermentação, timol

CHAPTER III – FERMENTATIVE LOSSES, AEROBIC STABILITY AND MICROBIOLOGY OF CORN SILAGES TREATED WITH ESSENTIAL OILS

Abstract: The objective of this study was to evaluate two essential oils, alone or in combination, in corn silage. There were used 20 experimental silos, divided into four treatments: control, without essential oils; thymol, 600 mg kg⁻¹ fresh forage; carvacrol, 400mg kg⁻¹ fresh forage; and combined, 250 mg kg⁻¹ fresh forage of thymol and 250 mg kg⁻¹ of carvacrol, with five replications in a completely randomized design. The silos were stored during 90 days in ambient temperature. There were determined DM, gases and effluent losses; microbial count; volatile organic compounds content; aerobic stability and measurement of pH values along the air exposure time; beyond chemical composition of fresh forage and silage. Mean dry matter losses were lower ($P<0.05$) in treatments containing oils, 3.39% in relation to control, 8.07%. Mean aerobic stability of essential oils was higher ($P<0.05$), with 46.4 hours, while in control silages it was 35.1 hours. Losses during air exposure showed no statistical difference ($P>0.05$). Lactic acid content in control was higher ($P<0.05$) than combined treatment, 48.4 g kg⁻¹ DMcorr and 30.2 g kg⁻¹ DMcorr, respectively. The ethanol content was also different ($P<0.05$), with the highest production of 8.02 gkg⁻¹ MScorr for control treatment and the lowest production of 6.66 g kg⁻¹ DMcorr for the treatment containing thymol. The variables ashes, ADF, CP, IVDMD and effluent losses did not show significant effect ($P<0.05$) among treatments, but DM was lower for control treatment, with 30.1%, in which it was also observed lower ($P<0.05$) soluble carbohydrates content (1.96% DM). Mean DM and SC content of the other treatments was 30.97% and 2.36% DM, respectively. Essential oils in this experiment condition had no effect ($P<0.05$) on yeast counts, but promoted lower dry matter losses and contributed to greater aerobic stability of treated corn silages.

Keywords: carvacrol, fermentation, lactic acid bacteria, thymol, volatile organic compounds

1.0 INTRODUÇÃO

Vestígios de um milho arqueológico encontrados em uma caverna localizada no México datam sua idade em 6.250 anos atrás (Piperno e Flannery, 2001), reforçando sua importância histórica na alimentação e no desenvolvimento da sociedade. Nos dias atuais, a planta de milho ainda representa grande valor, tanto na produção de grãos quanto na produção de silagem. No Brasil, a planta mais utilizada como silagem é o milho, visto que essa gramínea apresenta características excepcionais como produtividade, e por sua composição oferecer condições necessárias para confecção de uma boa silagem como: teor de matéria seca (MS) entre 30 e 35% no ponto de colheita, mínimo de 3% de carboidratos solúveis na matéria original, e baixo poder tampão, proporcionando boa fermentação microbiana (Nussio et al., 2001). Estas características da planta de milho permitem uma silagem de excelente qualidade, desde que todo o processo tenha ocorrido de maneira correta, dimensionamento adequado do silo, rápida retirada do ar durante a compactação promovendo ambiente anaeróbio, e vedação eficientes.

O uso de aditivos em silagens é uma alternativa para otimizar a produção, quando todas as fases anteriores foram realizadas de maneira correta. Em alguns casos, bactérias homoláticas são adicionadas às silagens com finalidade de acelerar a fermentação. Para que a fermentação láctica ocorra de maneira satisfatória, alguns critérios são importantes: ambiente anaeróbio, aliado à rápida queda do pH, causada pela acidificação do meio por ação de bactérias lácticas, que segundo Muck (1988) deve apresentar uma população de 10^8 ufc g⁻¹ de forragem fresca.

Após a abertura do silo, alguns exemplos de microrganismos indesejáveis que podem se estabelecer compreende as leveduras, *Clostridium* e *Listeria*, promovendo perdas e oferecendo riscos à saúde dos animais e seres humanos.

Silagens de milho são muito susceptíveis à deterioração aeróbia (Basso et al., 2012), sendo importante pesquisar alternativas a fim de minimizar esses efeitos. As bactérias heterofermentativas como o *Lactobacillus buchneri* são utilizadas como inoculantes microbianos, sendo o ácido acético o principal produto final de fermentação, o qual apresenta ação antifúngica, controlando a ação de fungos filamentosos e leveduras após a exposição ao ar (Pahlow et al., 2003; Ávila et al., 2009).

Na área de pesquisa com conservação de forragem na forma de silagem, existem muitos trabalhos abordando o uso de aditivos em silagem de milho (Kung et al., 2007; Sá Neto et al., 2013), porém trabalhos com óleos essenciais em silagem ainda são poucos.

Kung et al. (2008) foram os primeiros autores a incluir um *blend* de óleos essenciais em silagem de milho, com o objetivo de verificar a ação dos óleos essenciais na fermentação e estabilidade aeróbia da silagem, observar o consumo de matéria seca, produção e composição do leite de vacas em lactação. Os autores não observaram efeitos nas silagens aditivadas com óleos essenciais, talvez pela dosagem utilizada, de 40 e 80 mg kg⁻¹ de forragem fresca, porém quando infundiu esses aditivos no rúmen, perceberam a redução proporcional de acetato e incremento na proporção molar de propionato, com aumento na ingestão de matéria seca dos animais.

Dentro dessas premissas, o presente trabalho teve por objetivos utilizar dois óleos essenciais, timol e carvacrol, sozinhos ou combinados, e avaliar seu efeito sobre as perdas fermentativas, estabilidade aeróbia, e microbiologia de silagens de milho.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

O milho utilizado para compor o experimento teve seu plantio realizado no mês de novembro de 2014, sendo a variedade utilizada 2B655Hx, híbrido da empresa Agroceres. A plantadeira foi regulada a fim de permitir 6 a 7 sementes por metro linear, e 280 kg de adubo NPK 8-20-20 por hectare. A adubação de cobertura foi realizada 30 dias após o plantio, sendo utilizados 400 kg de ureia por hectare, conforme a análise de solo da área.

Para o controle de plantas invasoras foram realizadas capinas semanais. A colheita do milho foi feita de forma manual, coletando plantas de forma aleatória em toda área, 100 dias após o plantio, com teor de MS de 30,7% e pH 6,22. O material foi picado em picadora estacionária com tamanho médio de partícula de 10 mm. Foram utilizadas 20 minisilos experimentais, divididos em quatro tratamentos com cinco repetições conforme descrito nas sessões 2.1.2 e 2.1.3 do capítulo 2.

Os silos permaneceram fechados por 90 dias, em temperatura ambiente, e após este período foram abertos para determinar perdas fermentativas,

microbiologia e EA descritos nas sessões 2.1.4, 2.1.5 e 2.1.6 do capítulo 2. Durante o ensaio de EA foram colocados baldes com silagem de cada repetição para mensurar o pH a cada dois dias. As análises bromatológicas foram realizadas de acordo com a sessão 2.1.4 do capítulo 2, porém nas amostras de milho foi acrescentada a análise de extrato etéreo, segundo AOAC (1990) no Laboratório de Bromatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP. As análises bromatológicas foram realizadas no mês de agosto de 2015. Na Tabela 8 são apresentados valores referentes à composição bromatológica da forragem fresca no momento da ensilagem.

Tabela 8. Composição bromatológica do milho no momento da ensilagem.

Variáveis	Tratamentos ¹				Média	DP ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado		
MS (%)	30,3	30,9	30,7	30,9	30,7	0,28
pH	6,2	6,3	6,3	6,2	6,2	0,05
Cinzas (% MS)	3,0	2,55	2,7	3,0	2,8	0,02
FDN (% MS)	53,9	50,2	49,9	50,6	51,1	1,85
FDA (% MS)	28,8	26,9	27,0	26,7	27,3	0,97
PB (% MS)	6,1	5,6	5,7	5,8	5,8	0,21
EE (% MS)	2,2	2,1	2,2	2,0	2,1	0,09
CS (% MS)	5,1	8,8	5,1	7,7	6,7	1,87

¹ Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol – 400 mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg forragem fresca de timol + 250 mg/kg forragem fresca de carvacrol; ²DP: Desvio Padrão.

As contagens microbiológicas foram realizadas no momento da ensilagem na forragem fresca com finalidade de quantificar as populações epifíticas, que foram de 6,20 log ufc g⁻¹ de forragem fresca para bactérias ácido lácticas, 5,62 log ufc g⁻¹ de forragem fresca para leveduras, e 3,15 log ufc g⁻¹ de forragem fresca para bolores.

2.1 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos minisilos foram realizadas utilizando-se a metodologia dos quadrados mínimos, por meio do procedimento GLM do programa estatístico SAS, versão 9.1.3 para Windows (SAS, 2002). As médias foram comparadas com o uso do Teste de Tukey, ao nível 5% de significância. Para os dados de pH da estabilidade utilizou-se o proc Mixed do SAS.

3.0 RESULTADOS

A composição bromatológica das silagens de milho é apresentada na Tabela 9. Os valores de FDN tiveram maior diferença entre os óleos essenciais sozinhos, no caso timol e carvacrol, com cerca de 14% de diferença entre si. Nos resultados de CS, comparando os valores entre o combinado e o controle houve um decréscimo de meio ponto percentual nos valores.

Tabela 9. Composição bromatológica das silagens de milho

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
MS _{corr} (%)	30,1 ^b	30,9 ^a	30,8 ^a	31,1 ^a	0,11
Cinzas (% MS)	3,44	2,97	2,90	3,13	0,10
FDN (% MS)	49,1 ^{ab}	55,3 ^a	47,6 ^b	51,9 ^{ab}	1,01
FDA (% MS)	28,5	27,9	25,3	27,9	0,54
PB (% MS)	5,79	5,63	5,92	5,84	0,06
EE (% MS)	2,37	2,49	2,78	2,34	0,06
DIVMS (% MS)	68,7	70,5	69,6	70,4	0,33
CS (% MS)	1,9 ^b	2,2 ^{ab}	2,4 ^{ab}	2,4 ^a	0,07

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

¹ Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg forragem fresca de timol + 250 mg/kg forragem de carvacrol. ²Erro padrão da média.

Os dados de pH, perdas totais de matéria seca (PMS), produção de gases (PG) e produção de efluente (PE) são apresentados na Tabela 10. As PMS do controle foram mais de duas vezes superiores ao restante dos tratamentos, além das PG, que representaram ainda neste tratamento quase 98% das PMS.

Tabela. 10 Perdas fermentativas e valores de pH nas silagens de milho

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM ⁵
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
pH	3,7	3,6	3,6	3,7	0,00
PMS ² , % MS	8,0 ^a	3,8 ^b	4,1 ^b	2,1 ^b	0,56
PG ³ , % MS	7,8 ^a	3,6 ^b	3,9 ^b	1,9 ^b	0,56
PE ⁴ , kg t ⁻¹ forragem fresca	2,0	1,9	2,0	2,4	0,10

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

¹Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg forragem fresca de timol + 250 mg/kg forragem fresca de carvacrol.

²Perdas de Matéria Seca; ³Perdas por Gases; ⁴Perdas por Efluente; ⁵Erro padrão da média

As contagens microbiológicas de BAL, leveduras e bolores estão apresentadas na Tabela 11. Timol e combinado obtiveram juntos uma média de 5,15 log ufc g⁻¹ de forragem fresca de bactérias ácido lácticas, valor 0,65 pontos percentuais inferior à contagem desses mesmo microrganismos para o controle. Na contagem de bolores, mesmo com valor superior do tratamento controle, a falta de diferença estatística é relacionada com o erro padrão alto desta variável.

Tabela 11. Microbiologia das silagens de milho

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
BAL ³ , log ufc g ⁻¹ de forragem fresca	5,8 ^a	5,0 ^b	5,5 ^{ab}	5,3 ^b	0,07
Leveduras, log ufc g ⁻¹ de forragem fresca	4,8	4,8	4,7	4,8	0,04
Bolores, log ufc g ⁻¹ de forragem fresca	2,6	0,8	ND	ND	0,40

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).¹Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg forragem fresca de timol + 250 mg/kg forragem fresca de carvacrol; ²Erro padrão da média; ³BAL- bactéria ácido láctica.

Na Tabela 12, são apresentados os valores de compostos orgânicos voláteis, encontrados na silagem de milho. Nesses dados é possível observar uma maior diferença na concentração de ácido láctico do controle e do combinado, em que os valores deste ácido foram 37,6% superiores para o tratamento sem aditivo. Para o ácido acético houve um incremento em média de 1,7 pontos percentuais nos

tratamentos contendo carvacrol e combinado, em relação ao timol e o controle. O etanol obteve uma média de 6,60 g kg⁻¹ MS_{CORR} (timol, carvacrol e combinado) com uma produção quase 18% menor em relação ao controle.

Tabela 12. Compostos orgânicos voláteis presentes nas silagens de milho.

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
<i>g kg⁻¹ MS_{CORR}</i>					
Ácido láctico	48,4 ^a	45,1 ^a	39,9 ^b	30,2 ^c	0,16
Ácido acético	12,7 ^b	13,2 ^b	14,3 ^a	14,4 ^a	0,01
Etanol	8,0 ^a	7,0 ^b	6,5 ^b	6,3 ^b	0,01
2,3-Butanediol	1,0	1,1	1,1	1,1	0,00
<i>mg kg⁻¹ MS_{CORR}</i>					
Ácido fórmico	287,0	332,3	410,7	387,8	21,4
Metanol	163,4 ^a	159,7 ^{ab}	169,2 ^a	153,6 ^b	1,70
Lactato de etila	171,1 ^a	143,7 ^b	134,7 ^b	137,0 ^b	4,08
Acetato de etila	119,6 ^{ab}	115,8 ^{ab}	114,6 ^b	133,0 ^a	2,59
Ácido propiônico	127,5	121,0	109,3	108,2	3,45
1,2-Propanediol	101,6 ^b	126,3 ^a	79,7 ^{bc}	65,6 ^c	5,96
Ácido iso-valérico	41,3 ^a	21,0 ^b	16,7 ^b	14,5 ^b	2,61
Ácido butírico	44,3 ^a	20,7 ^b	15,0 ^b	13,3 ^b	3,23
Acetona	13,1	23,7	18,1	21,5	1,63
Ácido valérico	38,5 ^a	15,9 ^b	9,4 ^b	5,5 ^b	3,23
Álcool iso-propílico	14,4 ^{ab}	24,7 ^a	12,5 ^b	10,6 ^a	1,80
Ácido iso-butírico	18,9 ^a	6,5 ^b	7,0 ^b	6,4 ^b	1,50
2-Butanol	2,8	2,4	1,8	2,3	0,36
Acetato de propila	0,4 ^{ab}	1,1 ^{ab}	0,1 ^b	0,1 ^b	0,14
1-Propanol	ND	ND	ND	ND	ND

¹Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg forragem fresca de timol + 250 mg/kg forragem fresca de carvacrol.²Erro padrão da média; ND – Não identificado.

As variáveis relacionadas à estabilidade aeróbia são apresentadas na Tabela 13. Os óleos essenciais apresentaram EA superior em mais de 10 horas comparado ao controle. Na PMSE pode-se notar uma diferença de meio ponto percentual entre

o combinado e o controle, sendo que este tratamento apresentou maiores perdas de MS durante a exposição ao ar.

Tabela 13. Estabilidade aeróbia das silagens de milho.

Variáveis	Tratamentos ¹				EPM ²
	Controle	Timol	Carvacrol	Combinado	
Tac ³ , °C	13190 ^a	12607 ^{ab}	12222 ^b	12104 ^b	139
TTM ⁴ , horas	47,5 ^b	57,9 ^{ab}	61,7 ^a	61,6 ^a	1,81
EA ⁵ , horas	35,1 ^b	45,1 ^a	46,8 ^a	47,2 ^a	1,51
TM, °C	40,8	41,0	40,4	39,8	2,43
PMSE ⁶ , %	1,4 ^a	1,0 ^b	1,1 ^{ab}	0,9 ^b	0,57

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

¹Controle – sem óleo essencial; Timol – 600 mg/kg forragem fresca; Carvacrol - 400mg/kg forragem fresca; Combinado - 250 mg/kg forragem fresca de timol + 250 mg/kg forragem fresca de carvacrol;

²Erro padrão da média; ³Temperatura Acumulada; ⁴Tempo para atingir a temperatura máxima;

⁵Estabilidade Aeróbia; ⁶Perdas de Matéria Seca durante a Estabilidade aeróbia

A Figura 5, retrata a curva de pH mensurada na silagem durante a EA, onde é possível observar que o pH do controle se manteve maior em pelo menos 0,5 pontos ao longo das medições.

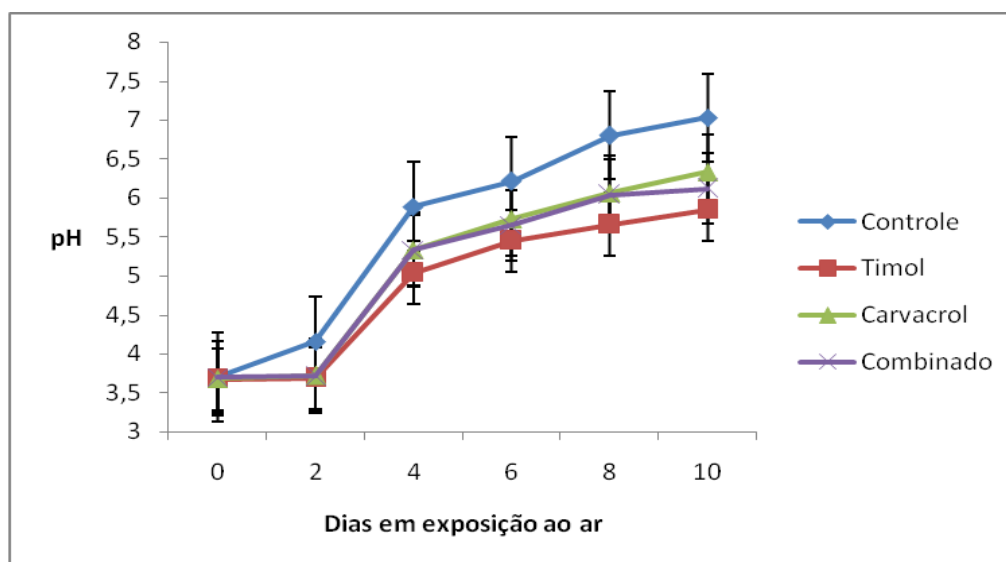


Figura 5. Valores de pH mensurados durante a estabilidade aeróbia das silagens de milho.

A Figura 6 ilustra os tratamentos controle e carvacrol, durante a EA, com a finalidade de representar características visuais, relacionadas principalmente à presença de bolores durante a exposição ao ar.



CONTROLE



CARVACROL

Figura 6. Características das silagens de milho após ensaio de estabilidade aeróbia.

4.0 DISCUSSÃO

A planta de milho utilizada para compor os tratamentos no momento da ensilagem estava dentro da faixa sugerida na literatura para uma fermentação eficiente, que seria entre 30 e 35% de MS (Nussio et al., 2001).

Os valores de MS_{CORR} estão próximos aos resultados encontrados por Junges et al. (2013), em silagens de milho em que o valor de MS do tratamento controle (sem aditivos) foi de 29,3%. Kung et al. (2008), ao avaliarem a adição de uma mistura de óleos essenciais à base de timol, eugenol, vanilin e limoneno, nas proporções de 40 e 80 mg kg⁻¹ de forragem fresca em silagem de milho, não observaram diferença estatística nos dados de matéria seca entre os tratamentos, com valores médios de 26,1%. Foskolos et al. (2016), utilizando timol e carvacrol, em silagem de azevém também não observaram efeito dos tratamentos sobre os teores de MS.

Os teores de cinzas não diferiram estaticamente ($P>0,05$), porém estão de acordo com os encontrados por Novinski et al. (2012), de 3,3% na MS em silagem de milho com 32,4% MS. Os valores de FDN deste trabalho estão acima dos valores encontrados por Kleinschmit et al. (2005), Rocha et al. (2006) e Queiroz et al. (2013). No presente estudo, a diferença entre os teores de FDN aconteceu entre o tratamento timol e carvacrol.

Os valores de FDA não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$), porém, não estão fora dos padrões de silagem de milho encontrados por Kleinschmit et al. (2005) e Novinski et al. (2012). Já Rocha et al. (2006) e Junges et al. (2013) encontraram valores inferiores de FDA, de 22,9 e 24,57% MS, em silagens de milho com 38,1 e 29,3% de MS, respectivamente.

A proteína bruta das silagens, quando comparada aos dados da literatura (Rocha et al., 2006; Novinski et al., 2011; Queiroz, 2013; Schmidt et al., 2015) também em silagens de milho, estão abaixo do observado, porém, não há relação entre a ação de óleos essenciais e a baixa PB na silagem de milho. No entanto, os óleos se mostraram eficientes em controlar as perdas de proteína bruta em silagens de azevém (Foskolos et al., 2016).

Os teores de EE estão de acordo com os dados de silagem de milho encontrados na literatura, onde dados de amostras coletadas em 327 fazendas, apresentaram média de 2,8% de EE na MS (Schmidt et al., 2015).

A digestibilidade da silagem de milho não apresentou diferença estatística ($P>0,05$), porém os dados ficaram de acordo com os observados por Silva et al. (2005) e Queiroz (2013), de 68,6% e 71,8% da MS, em silagens com 30,2% e 28,1% MS, com 56 e 120 dias de fermentação, respectivamente.

O maior ($P<0,05$) teor de CS do tratamento combinado em relação ao controle pode ser atribuído aos microrganismos fermentadores (BAL), que a partir da fermentação dos carboidratos solúveis (frutose ou glicose), os converte em ácidos (McDonald et al., 1991).

Como parâmetro para avaliar a acidez da silagem temos o pH, variável de extrema importância, pois quanto menor é o valor, maior a conservação do material. Os dados de pH não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$), mas mesmo assim os valores corroboram com os encontrados por Kung Jr. et al. (1998), Junges et al. (2013) e Daniel et al. (2015), em silagem de milho. A silagem de milho não apresenta resistência ao abaixamento do pH, ou seja, tem baixa capacidade

tampão, característica importante para impedir ação de microrganismo oportunistas, como é o caso de leveduras, que podem ser inativadas pelo baixo pH (McDonald et al., 1991).

Os maiores ($P < 0,05$) teores de MS dos tratamentos com óleo essencial pode ser associado com os dados de perdas de matéria seca da Tabela 10. Durante o processo de fermentação os óleos reduziram as perdas e, conseqüentemente, os valores de matéria seca ficaram superiores aos do controle.

A produção de efluente não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos, com valores abaixo dos encontrados por Junges et al. (2013) em silagem de milho com MS de 29,3%, com produção de 18,75 kg t⁻¹ de forragem. Já Souza (2015) encontrou valores semelhantes na silagem de milho com MS de 27,3%, de 2,40 kg t⁻¹ de forragem. A autora ainda comenta que as perdas por efluente representam muito pouco em relação às perdas totais de matéria seca, ao contrário das perdas por gases, que podem chegar a representar 90% das perdas totais de matéria seca.

Era esperado que a principal atuação dos tratamentos contendo óleo essencial fosse controlar o crescimento de leveduras durante a ensilagem, sem prejudicar o crescimento de bactérias ácido lácticas, porém, isso não aconteceu no momento da abertura dos silos, onde a contagem de leveduras superou a contagem de bactérias (Tabela 11). Entretanto, esta contagem só diz respeito à abertura do silo, sendo que durante o processo de fermentação o perfil de crescimento pode ter acontecido de forma diferente, mas esta contagem ao longo dos dias de fermentação não foi realizada neste experimento. Os valores encontrados da contagem estão de acordo com o observado por Kleinschmit et al. (2005) e Queiroz (2013), de 4,43 e 4,90 log ufc g⁻¹ de forragem fresca, respectivamente. Porém, durante o período de 90 dias de ensilagem, pode ter ocorrido o controle das populações de leveduras, pois se comparadas às contagens encontradas por Kung Jr. et al. (1998) em silagens de milho, os valores ainda são baixos, pois os autores observaram contagens de 5,4 e 5,1 log ufc g⁻¹ de forragem fresca, com 75 e 95 dias de fermentação, e teor de MS de 34,3 % e 28,9 %, respectivamente.

Já as contagens de BAL foram baixas, porém ainda dentro do intervalo normalmente encontrado em silagem de milho de 5,32 a 7,9 log ufc g⁻¹ de forragem fresca (Weinberg et al., 2001; Sá Neto et al., 2013). Os tratamentos timol e combinado tiveram menor ($P < 0,05$) contagem em relação ao controle. A presença

do timol nestes dois tratamentos reduziu significativamente o crescimento de bactérias, e sua ação nesses organismos pode ter acontecido de várias maneiras, seja na ruptura da integridade da membrana celular (Burt, 2004), ou ainda atuando no mecanismo de *Quorum Sensing*. Burt et al. (2014) observaram que o óleo essencial de orégano que também possui timol em sua composição, inibe este mecanismo de comunicação das bactérias *Quorum Sensing*, cessando a formação do biofilme, sendo este por sua vez responsável pela proteção das bactérias tanto gram-positivas quanto gram-negativas. Nas bactérias este mecanismo é utilizado na comunicação entre elas, liberação de hormônios chamados autoindutores, pode alterar o comportamento das colônias de bactérias, e monitorar o ambiente em que elas vivem (Water e Bassler, 2005).

Os bolores também não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$), porém, os valores das silagens tratadas estão baixos quando comparados à uma silagem de milho sem aditivos. Muck (2004) observou valores de 3,80, 3,23 e 2,67 log ufc g⁻¹ de forragem fresca, avaliando três anos consecutivos (1999, 2000 e 2001) de produção de silagem de milho. Kung Jr. et al. (2008), ao utilizarem uma mistura de óleos essenciais nas proporções de 40 e 80 mg kg⁻¹ de forragem fresca, não observaram diferença estatística na contagem de bolores, o que está de acordo com este trabalho, porém a média encontrada pelos autores estão acima do observado no presente estudo, de 4,31 log ufc g⁻¹ de forragem fresca, em silagens com MS média de 27%.

Os microrganismos encontrados na silagem estão relacionados com a produção de compostos orgânicos voláteis, os quais são apresentados na Tabela 12. Com os dados dos carboidratos solúveis e contagem de BAL, pode-se encontrar uma relação com os dados de compostos orgânicos voláteis, principalmente entre os tratamentos controle e combinado. Mesmo com a contagem microbiológica total de bactérias ácido lácticas ter sido mais baixa no tratamento timol, houve a produção de ácido láctico com valores próximos aos encontrados por Daniel et al. (2015), de 42,9 g kg⁻¹ de MS_{CORR} em silagens de milho. A contagem total de BAL engloba tanto bactérias homoláticas, que têm como produto da fermentação somente o ácido láctico (McDonald et al., 1991), quanto as heteroláticas, que têm como produtos de fermentação o ácido láctico, acético, propiônico, etanol, CO₂ e água. Neste trabalho não foi realizada a caracterização e identificação das espécies, porém, analisando os resultados entre a contagem total de BAL e a produção de ácido láctico, pode-se

perceber que apesar da diferença significativa na contagem total de bactérias ácido lácticas entre o controle e o timol, quando esse resultado é extrapolado para a quantidade de ácido láctico produzido durante a fermentação os valores foram iguais. Este fato sugere que o timol, mesmo com a menor contagem total de BAL em relação ao controle (5,07 vs 5,84 log ufc g⁻¹ forragem fresca), pode ter agido na seleção de bactérias homoláticas.

Nas silagens tratadas com carvacrol, a contagem de BAL, mesmo sendo igual aos tratamentos controle e timol, foi observada redução ($P < 0,05$) nos valores de ácido láctico, o que sugere que este tratamento pode ter reduzido a população de bactérias homoláticas e ter preservado a população de heteroláticas, pois ao analisar a produção de ácido acético, esta foi maior ($P < 0,05$) que o controle e o timol. O combinado, por sua vez, mesmo com a contagem de BAL semelhante aos demais tratamentos com óleo essencial, foi o que apresentou as menores ($P < 0,05$) produções de ácido láctico, confirmada pelo maior pH deste tratamento na abertura dos silos após 90 dias de fermentação (Tabela 10). Pode ter acontecido um efeito sinérgico entre o timol e carvacrol, potencializando seus efeitos sobre homoláticas (Lambert et al., 2001).

A produção de ácido acético está de acordo com a encontrada por Weinberg et al. (2001) e Daniel et al. (2015), de 16,3 g kg⁻¹ MS e 11,4 g kg⁻¹ MS_{CORR}. A produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido acético, é relacionada com a maior estabilidade aeróbia em silagens por este composto apresentar ação antifúngica (Driehuis et al., 1999).

Uma das formas de perdas na silagem é a produção de etanol pela fermentação de leveduras (McDonald et al., 1991), e outra possibilidade é a fermentação heterolática, que a partir de uma molécula de glicose resulta em 1 mol de ácido láctico, mais 1 mol de etanol e CO₂ (Muck, 2010). A menor ($P > 0,05$) produção de etanol dos tratamentos contendo óleos essenciais sugere que pode ter acontecido a seleção de BAL, controlando crescimentos de heteroláticas. Dentro da categoria das homoláticas, McDonald et al. (1991) citam *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* e *Streptococcus faecium*. Dunn et al. (2016), ao mensurarem a ação dos óleos essenciais sobre BAL, constataram que gram-positivas são mais susceptíveis que gram-negativas, com algumas exceções. Os autores mediram a concentração mínima inibitória (MIC) do timol e carvacrol, sendo que quanto maior o valor de MIC, mais potente é o óleo. O *Lactobacillus plantarum*

foi mais susceptível ao timol (MIC 0,05%) do que ao carvacrol (MIC 0,1%), enquanto *Lactobacillus buchneri* obteve o mesmo valor de MIC (0,1%) para ambos óleos. Já o *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus brevis* também obtiveram o mesmo MIC, no entanto com concentrações inferiores, de 0,05%. Desta forma, de acordo com os dados do presente estudo, possivelmente, a população de BAL predominante no tratamento timol não foi de *L. plantarum* uma vez que a produção de ácido láctico foi semelhante ao tratamento controle, e superior aos demais tratamentos com óleo (Tabela 12).

Os valores dos COV lactato de etila, ácido isovalérico, butírico, valérico e iso-butírico dos tratamentos contendo óleos foram menores ($P < 0,05$). A produção de butirato é indesejável em silagem, já que este ácido orgânico está relacionado com a população de *Clostridium*, e este, por sua vez, relacionado às perdas no valor nutritivo, principalmente proteína, consumo e redução de ácido láctico, provocando elevação no pH e catabolismo de aminoácidos (McDonald et al., 1991). Os valores de ácido butírico deste trabalho estão abaixo dos encontrados por Rabelo et al. (2015), de 1200 mg kg^{-1} em silagens de milho não aditivadas. O lactato de etila é relacionado com a produção de etanol e ácido láctico, já o acetato de etila é relacionado com etanol e ácido acético (Daniel et al., 2015), e esta relação pode ser observada principalmente dentro do tratamento combinado.

McDonald et al. (1991) e Oude Elferink et al. (2000) descrevem a produção de silagem em quatro fases, sendo a última delas a fase de exposição ao ar ou abertura do silo. Nesta fase é importante manter a qualidade do produto fermentado, porém, após a exposição ao ar, ocorre o crescimento de microrganismos como leveduras, bolores e enterobactérias. Estes microrganismos usam o ácido láctico produzido pelas BAL como substrato e, conseqüentemente, elevam o pH do meio.

Os tratamentos contendo óleos essenciais tiveram maior ($P < 0,05$) estabilidade que o controle (Tabela 13), apesar da ausência de efeito significativo na contagem de leveduras. Porém, ao comparar a variável hora para atingir a temperatura máxima, o timol não apresentou diferença ($P > 0,05$) em relação aos outros tratamentos, e somente o carvacrol e o combinado tiveram maior número de horas até atingir a temperatura máxima. Os óleos podem ter sua ação maior sobre a conservação da silagem durante a exposição ao ar, apesar da não identificação de microrganismos durante a EA, eles podem ter sido eficientes em controlar o crescimento de microrganismos deterioradores.

Kung Jr. et al. (2008) não verificaram efeitos dos óleos essenciais sobre a estabilidade aeróbia de silagens de milho, e não mensuraram perdas de matéria seca durante a estabilidade. Ainda dentro do processo de exposição aeróbia ocorrem perdas de matérias seca, e segundo McDonald et al. (1991) esses valores podem ser superiores a 15% MS. As PMS deste experimento estão próximas aos resultados encontrados por Novinski et al. (2011), ao avaliarem estabilidade aeróbia e perdas de MS em silagens de milho aditivadas com diferentes doses de natamicina, com média de 2,4% MS (1,65-3,42% MS). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) para a variável temperatura máxima, porém esses valores estão acima dos encontrados por Bereterbide et al. (2015), em silagens de milho não aditivadas, chegando a temperatura máxima de 30,4°C.

Segundo Ranjit e Kung Jr. (2000), as silagens, quando expostas ao ar, favorecem o crescimento de microrganismos oportunistas, que consomem carboidratos residuais e o ácido láctico, sendo os principais causadores de deterioração aeróbia as leveduras *Saccharomyces* e *Candida*. Uma medida indireta que pode ser realizada para avaliar a estabilidade aeróbia das silagens é a aferição do pH. Esta variável pode indicar que os ácidos que conservam a silagem estão sendo consumidos, deixando o material menos estável e provocando seu aquecimento. Desta forma, é esperado que o pH da silagem exposta ao ar, ao passar dos dias, se comporte de forma crescente (McDonald et al., 1991).

O pH do tratamento controle manteve-se crescente, entretanto, nos tratamentos contendo óleo essencial, do dia zero para o segundo dia houve uma redução dos valores. A partir do segundo dia o comportamento dos tratamentos contendo OEs foi crescente, e quando comparado ao controle tiveram menor pH, sugerindo que durante a exposição ao ar os óleos essenciais foram eficientes em controlar microrganismos que utilizam os ácidos como substrato. O menor pH após o primeiro dia de exposição ao ar, a princípio, gerou uma certa atenção e foi tratado como possível erro de amostragem, porém, esse menor pH ao passar dos dias pode acontecer. Nishino et al. (2007), trabalhando com dieta total ensilada, não observaram diferença estatística, porém demonstraram a queda do pH durante a exposição ao ar, com valores de 4,19 para o dia 0 e 4,14 para o 14º dia em exposição ao ar.

Mesmo não realizando a contagem microbiológica das silagens durante a estabilidade aeróbia, era visível a diferença entre os tratamentos. O controle pela

análise visual e olfativa apresentava características não agradáveis como odor, coloração mais escura e esporos de bolores em alta quantidade, já os tratamentos contendo óleos essenciais apresentavam odor característico dos óleos, e a quantidade de esporos era visualmente muito baixa se comparada ao tratamento controle (Figura 6). Apesar da qualidade visual da silagem ser uma medida indireta, pode ser utilizada pelos produtores, que muitas vezes não dispõem de meios para mensurar a qualidade do material ensilado.

5.0 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais não foram eficientes em controlar leveduras encontradas na silagem de milho, e ainda o tratamento contendo timol reduziu a população de bactérias ácido lácticas da silagem, contudo houve redução nas perdas por gases, perdas de matéria seca e os aditivos nas condições deste experimento, ainda aumentaram a estabilidade aeróbia das silagens. Os óleos essenciais de maneira geral, apresentaram excelentes resultados no perfil fermentativo, e de acordo com os resultados eles podem ter retardado o crescimento de leveduras e contribuído para a fermentação da forragem. A forma de atuação dos óleos essenciais dentro do silo deixa algumas dúvidas de como o aditivo atuou no ambiente da silagem, e sugerem mais estudos nesta área.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais apresentam-se com grande potencial no combate a agentes microbiológicos. Estão sendo estudados em diversas linhas de pesquisa, seja na saúde humana ou animal, linha de fármacos, odontologia, anestésicos naturais, incremento na produtividade animal, microbiologia e conservação de alimentos. Porém, existem algumas limitações na questão de padronização dos produtos, composição, e doses eficazes para inibir microrganismos.

A grande contribuição que este trabalho faz para a pesquisa é que os aditivos utilizados (timol e carvacrol) foram sintetizados e com alto grau de pureza, e quando a extração é realizada na natureza é mais difícil alcançar esse grau de pureza e afirmar a composição exata do produto. Talvez neste sentido os outros autores de trabalhos utilizando óleos essenciais como aditivos em silagem possam não ter observado efeitos tão desejáveis quanto aos encontrados neste estudo.

Mesmo apesar dos OEs terem limitado o crescimento de BAL e da falta de ação sobre o crescimento de leveduras na abertura dos silos, ainda foi possível observar efeitos positivos durante a fermentação e exposição ao ar. Estabelecer o porquê dessa falta de ação sobre leveduras é algo a se discutir, pois o ambiente da silagem é muito específico. Porém, partindo do princípio que a ação dos óleos essenciais é dependente do pH, e que seus efeitos são potencializados em pH baixo e em meio anaeróbico, não haveria limitações para a sua ação sobre leveduras e bolores.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analyses of the AOAC. 15ed. Washington, **Assoc. OFF. Agric.** 1990.

ÁVILA, C.L.S. et al. Aerobic stability of Mombaça grass silages treated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 5, p. 779-787, 2009.

BASSO, F. et al. Fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silages inoculated with different levels of *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 11, p. 2369-2373, 2012.

BERETERBIDE, L. et al. Aerobic stability of whole plant corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* in three maturity stages. **XVII International Silage Conference, Piracicaba- São Paulo**. pg 358-359, 2015.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **Int. Journal Food Microbiology**. 94: 233-253, 2004.

BURT, S.A. et al. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93414, 2014.

DANIEL, J.L.P. et al. A meta-analyses of the effects of length of storage on starch digestibility and aerobic stability of corn silages. **XVII International Silage Conference, Piracicaba, São Paulo**, 2015.

DRIEHUIS, F. et al. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of applied Microbiology**, v. 87, n. 4, p. 583-594, 1999.

DUNN, L.L. et al. Antimicrobial Efficacy of an Array of Essential Oils Against Lactic Acid Bacteria. v. - 81, n. - 2, p. - M444, 2016. ISSN - 1750-3841, 2016.

FOSKOLOS, A. et al. Effects of essential oil compounds addition on ryegrass silage protein degradation. **Canadian Journal of Animal Science**, 2016. ISSN 0008-3984. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1139/CJAS-2015-0025>>. Acesso em: 016/03/24.

JUNGES, D. et al. Additive containing homo and heterolactic bacteria on the fermentation quality of maize silage. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 35, p. 371-377, 2013.

KLEINSCHMIT, D. H.; SCHMIDT, R. J.; KUNG JR., L. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2130-2139, 2005.

KUNG Jr., L. et al. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4793-4800, 2008.

KUNG Jr., L. et al. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1322-1330, 1998.

LAMBERT, R.J.W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. Marlow: Chalcombe Publications, 340p, 1991.

MUCK, R.E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.11, p.2992-3002, 1988

MUCK, R.E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. **Transactions of the ASAE**, v. 47, n. 4, p. 1011, 2004.

MUCK, R.E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 183-191, 2010.

NISHINO, N. et al. Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage inoculated with and without homofermentative or heterofermentative lactic acid bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 13, p. 2420-2426, 2007.

NOVINSKI, C.O. et al. Estabilidade aeróbia de silagens de milho aditivadas com Natamicina. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Brasília. Anais...** Brasília: SBZ, 2012.

NUSSIO, L.G. Determinação do ponto de maturidade ideal para colheita do milho para silagem. **Milho para a silagem. Piracicaba: FEALQ**, p. 11-26, 2001.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H. et al. Silage fermentation processes and their manipulation. In: **FAO ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE**, Rome, 1999. Silage making in the tropics with emphasis on smallholders; proceedings. Rome: FAO, p.17-30, 2000.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: **Silage science and technology**1.ed. Madison: American Society of Agronomy, p.31-94, 2003.

PIPERNO, D.R.; FLANNERY, K.V. "The Earliest Archaeological Maize (*Zea mays* L.) from Highland Mexico: New Accelerator Mass Spectrometry Dates and Their Implications." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2101–2103, 2001.

QUEIROZ O.C.M. et al. Effect of plant population on the morphology and yield of corn plants and the chemical composition o corn silage. **XVII International Silage Conference- Piracicaba, São Paulo**, pg, 264-265, 2015.

RABELO, C.H.S. et al. Chemical composition, digestibility and aerobic stability of corn silages harvested at different maturity stages. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 2, p. 107-116, 2015.

RANJIT, N.K.; KUNG JR., L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.526-535, 2000.

ROCHA, K.D. et al. Valor nutritivo de silagens de milho (*Zea mays* L.) produzidas com inoculantes enzimo-bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.389-395, 2006.

SÁ NETO, A. et al. Silagem de milho ou de cana-de-açúcar com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em associação com *L. plantarum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 528-535, 2013.

SAS INSTITUTE. *SAS user's guide: statistics, version 9.0*. Cary: SAS Institute, 2002.

SCHMIDT, P. et al. Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage. A farm survey using infrared thermography. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1-11, 2015.

SOUZA, C.M. **Impacto ambiental da produção de silagens: Revisão da literatura e avaliação experimental em silos laboratoriais**. Dissertação apresentada como parte das exigências ao título de Mestre em Ciência Animal, UFPR, 2015.

WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 319-346, 2005.

WEINBERG, Z. G. et al. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 561-566, 2001.